

Université de Sherbrooke

**Effets physiologiques de la caféine et/ou de la pression positive continue nasale sur les événements cardiorespiratoires des chémoréflexes laryngés chez l'agneau prématuré**

Par  
Nadia Boudaa  
Départements de physiologie et de pédiatrie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé  
En vue de l'obtention du grade de maître ès science (M. Sc)  
En physiologie

Sherbrooke, Québec, Canada  
Septembre 2012

Membres du jury d'évaluation :

Pr André Cantin (département de médecine)  
Pr Ahmed Chraïbi (département de physiologie et biophysique)  
Pr Jean-Paul Praud (département de pédiatrie)

© Nadia Boudaa, 2012



Library and Archives  
Canada

Published Heritage  
Branch

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*ISBN: 978-0-494-93274-2*

*Our file Notre référence*

*ISBN: 978-0-494-93274-2*

#### NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

#### AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

## RÉSUMÉ

### ***Effets physiologiques de la caféine et/ou de la pression positive continue nasale sur les événements cardiorespiratoires des chémoréflexes laryngés chez l'agneau prématuré***

PAR

Nadia Boudaa

**Introduction:** Les chémoréflexes laryngés (CRL) chez l'agneau prématuré se manifestent fréquemment par des apnées et des bradycardies sévères pouvant mettre en jeu le pronostic vital. La pression positive continue nasale (PPCN) et la caféine font partie des stratégies thérapeutiques employées en néonatalogie pour la prise en charge des apnées du prématuré.

**Objectif:** L'objectif principal de cette étude est d'évaluer les effets de la caféine et/ou de la PPCN sur les événements cardiorespiratoires survenant lors des CRL chez les agneaux prématurés. L'objectif secondaire est d'améliorer le modèle d'agneaux nés prématurément.

**Méthodologie:** 7 agneaux prématurés (âge gestationnel de 133 jours vs 147 jours à terme) nés par voie basse, suite à l'administration intramusculaire de bétaméthasone (corticoïde favorisant la maturation pulmonaire) et de mifépristone (un anti progestatif) ont été instrumentés chirurgicalement au 5<sup>ème</sup> jour de vie afin de recueillir les stades de conscience, les activités musculaires laryngées et des variables cardiorespiratoires. De plus, un cathéter supra-glottique transcutané a été installé afin d'induire des CRL durant le sommeil calme par l'HCl et le lait de brebis dans 4 conditions randomisées: 1) sans PPCN et sans caféine (condition contrôle); 2) avec PPCN (5 cmH<sub>2</sub>O) mais sans caféine (PPCN); 3) avec caféine mais sans PPCN; 4) avec PPCN et caféine. Les mouvements respiratoires ont été recueillis via pléthysmographie d'inductance respiratoire et la saturation a été mesurée par oxymétrie pulsée.

**Résultats:** Avec une prise en charge continue non invasive durant les 48 premières heures de vie, le taux de survie des agneaux prématurés a été de 90% vs 50% du modèle précédent (St-Hilaire et al., 2007). Par ailleurs, la PPCN a diminué l'inhibition cardiorespiratoire des CRL vs la condition contrôle, incluant le temps passé en apnée (2 vs 10s,  $p = 0,004$ ), en bradycardie (2 vs 12s,  $p = 0,007$ ) et le pourcentage de diminution de la SpO<sub>2</sub> (4 vs 9%,  $p = 0,07$ ), contrairement à la caféine qui n'a globalement pas eu d'effet.

**Conclusion:** La PPCN améliore les événements cardiorespiratoires liés aux CRL chez l'agneau prématuré, ce qui suggère son utilisation comme alternative thérapeutique dans les apnées du prématuré pour lesquelles l'implication des CRL est fortement suspectée.

**Mots clés:** Agneau prématuré; chémoréflexes laryngés; caféine; pression positive continue nasale; apnées du prématuré.

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	II
TABLE DES MATIÈRES .....	III
LISTE DES FIGURES .....	IV
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	V
INTRODUCTION .....	1
<i>Les chémoréflexes laryngés (CRL)</i> .....	1
Origine des CRL .....	1
Circuit nerveux des CRL .....	2
<i>CRL et inhibition cardiorespiratoire</i> .....	4
<i>Apnées du prématuré</i> .....	4
<i>Prise en charge des apnées du prématuré</i> .....	5
<i>Contexte de l'étude</i> .....	6
AVANT PROPOS DE L'ARTICLE .....	8
RÉSUMÉ EN FRANÇAIS DE L'ARTICLE .....	9
ARTICLE .....	10
EFFECTS OF CAFFEINE AND/OR NASAL CPAP TREATMENT ON LARYNGEAL CHEMOREFLEXES IN PRETERM LAMBS	
DISCUSSION .....	39
<i>Modèle d'agneau prématuré</i> .....	39
<i>Chémoréflexes laryngés</i> .....	42
<i>Effet de la caféine</i> .....	43
Mécanisme d'action .....	43
Posologie et pharmacodynamique .....	44
Propriétés .....	44
Complications et effets indésirables .....	44
Efficacité de la caféine dans les apnées du prématuré .....	45
<i>Effet de la pression positive continue nasale</i> .....	47
Effets physiologiques .....	47
Indications .....	47
Avantages .....	47
Complications .....	48
Efficacité de la PPCN .....	48
<i>Limitation de l'étude</i> .....	48
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....	50
REMERCIEMENTS .....	51
RÉFÉRENCES .....	52

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Circuit nerveux des Chémoréflexes Laryngés. (Reix et al., 2007),  
modifiée par Gestreau ..... **Erreur ! Signet non défini.**

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>AG</b>	âge gestationnel
<b>ALTE</b>	malaises graves du nourrisson
<b>AMPc</b>	adénosine monophosphate cyclique
<b>ATP</b>	adénosine triphosphate
<b>Cl</b>	chlore
<b>CRF</b>	capacité résiduelle fonctionnelle
<b>CRL</b>	chémoréflexes laryngés
<b>IM</b>	intramusculaire
<b>IV</b>	intraveineux
<b>SMSN</b>	syndrome de mort subite du nourrisson
<b>PGE2</b>	prostaglandine E2
<b>PPCN</b>	pression positive continue nasale
<b>TRH</b>	thyrotropin-releasing-hormone
<b>VAI</b>	voies aériennes inférieures
<b>VAS</b>	voies aériennes supérieures
<b>Vs</b>	versus

## INTRODUCTION

### Les chémoréflexes laryngés (CRL)

Se définissent comme un ensemble de réflexes déclenchés suite au contact d'un liquide avec la muqueuse laryngée. Il s'agit de mécanismes de protection des voies aériennes inférieures (VAI) qui chez le sujet mature (sujet adulte ou nouveau-né à terme en santé) incluent :

- une fermeture de la glotte avec courte pause respiratoire pour prévenir l'aspiration du liquide;
- des déglutitions et de la toux pour expulser le liquide;
- une réaction d'éveil si le sujet est endormi associée à une vasoconstriction périphérique et à une augmentation de la pression artérielle afin de mieux redistribuer le flux sanguin au niveau des organes nobles (Thach, 2001; St-Hilaire et al., 2007).

### **Origine des CRL**

Elle remonte à la période anténatale où le fœtus entouré de liquide amniotique contenant des débris cellulaires, des squames cutanées, de lanugo et du méconium va développer des réflexes lui permettant de prévenir l'aspiration trachéale de liquide amniotique lors des mouvements respiratoires fœtaux. Ces réflexes sont générés par des récepteurs laryngés sensibles au  $[Cl^-]$ , en rapport avec la différence de gradient de concentration en  $[Cl^-]$  entre le liquide trachéal (170mEq/l) et le liquide amniotique (80mEq/l).

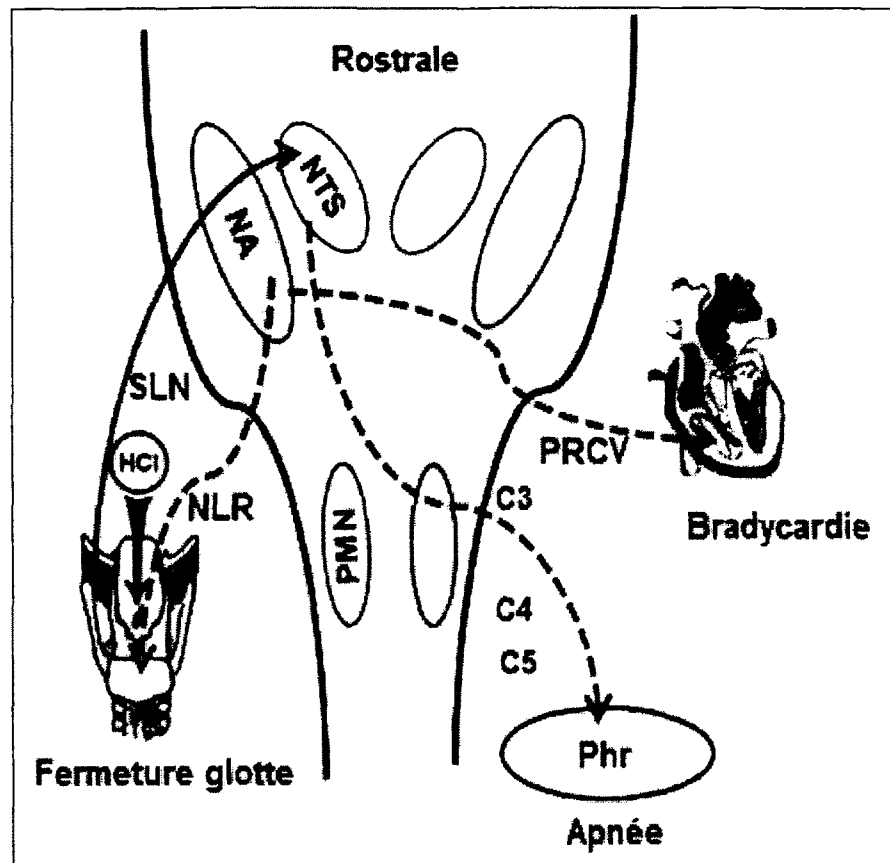
Durant la vie fœtale, les CRL sont de type immature avec un arrêt prolongé de la respiration associé à des bradycardies (Praud, 2010; Thach, 2001). La présence de tels événements durant cette période de la vie ne compromet pas le pronostic vital car les échanges gazeux du fœtus sont assurés par le cordon ombilical via le placenta.

L'immaturité du système nerveux central du prématuré à la naissance fait que les CRL sont potentiellement dangereux avec une prédominance de l'inhibition cardiorespiratoire similaire à celle observée chez le fœtus (St-Hilaire et al., 2007; Thach, 2001).

### **Circuit nerveux des CRL**

Le contact d'une solution avec la muqueuse laryngée engendre une stimulation des récepteurs laryngés. L'influx nerveux secondaire à ce stimulus est véhiculé via le nerf laryngé supérieur jusqu'au niveau du bulbe rachidien; de là l'information nerveuse est intégrée aussi bien au niveau du noyau du tractus solitaire qu'au niveau du noyau ambigu et est relayé par différentes voies efférentes neuronales influençant l'activité du nerf laryngé récurrent (laryngospasme), des neurones cardioinhibiteurs vagues (bradycardies) et du nerf phrénique (apnées) (Praud, 2010) (Figure1).





**Figure 1 : Circuit nerveux des Chémoréflexes Laryngés. (Reix et al., 2007), modifiée par Gestreau**

**Légende :**

- PRCV : neurones cardio inhibiteurs vagues
- NTS : noyau du faisceau solitaire
- RLN : nerf laryngé récurrent
- Phr : centre phrénique
- NA : noyau ambigu
- PMN : noyau moteur phrénique

## **CRL et inhibition cardiorespiratoire**

De nombreux facteurs environnementaux peuvent aggraver l'inhibition cardiorespiratoire secondaire aux CRL. Parmi ces facteurs : l'hypoxie (Sladek et al., 1993), l'infection par le virus respiratoire syncytial (Pickens et al., 1989), l'hyperthermie (Xia et al., 2008), l'exposition environnementale à la fumée de cigarette (St-Hilaire et al., 2010), la laryngite de reflux (Carreau et al., 2011) et la prématurité (St-Hilaire et al., 2007).

Les CRL sont impliqués par de nombreux chercheurs dans les pathologies responsables du dysfonctionnement du contrôle respiratoire durant la période néonatale tels que les malaises graves (ALTE) et le syndrome de mort subite (SMSN) du nourrisson (Thach, 2001; Praud, 2010; Leiter et al., 2007).

Bien qu'il persiste une chaude controverse sur l'association temporelle entre reflux gastriques et CRL dans l'étiopathogénie des apnées du prématuré (Poets et al., 2011; Slocum et al., 2007; Nunez et al., 2011), de nombreux chercheurs pensent que les reflux laryngopharyngés et l'alimentation par biberon peuvent être impliqués dans la physiopathologie des apnées du prématuré, par l'intermédiaire des CRL (Leiter et al., 2007; Thach, 2008; Praud, 2010).

## **Apnées du prématuré**

Les apnées chez le prématuré constituent un problème récurrent résultant d'une immaturité physiologique de la régulation de la respiration, qui porte essentiellement sur la chémosensibilité centrale et périphérique et les réponses aux stimulations des voies aériennes, particulièrement laryngées (Morielle et al., 2010). L'hypoxie significative conséquence de certains épisodes apnéiques répétés est associée à un risque élevé de morbidité incluant la rétinopathie du prématuré et une altération du développement neurologique avec possibilité de séquelles pour la vie (Aranda et al., 2010).

Selon l'académie américaine de médecine du sommeil en 2007 (Nunez et al., 2011) une apnée se définit comme un arrêt de la respiration dont la durée est supérieure à celle de deux cycles respiratoires.

Les apnées sont classées en 3 types :

- obstructive: si persistance des efforts respiratoires;
- centrale: qui correspond à un arrêt des efforts respiratoires  $\geq 20$  s ou durant plus de 2 cycles respiratoires, si elle est associée à une réaction d'éveil ou à une désaturation  $\geq 3\%$ ;
- mixte: apnée centrale qui devient obstructive.

On parle d'apnées du prématuré si les apnées surviennent avant 37 semaines d'âge gestationnel (AG); les apnées sévères vont entrainer une hypoxie cérébrale (Poets, 2010) responsable d'altérations ultérieures du développement psychomoteur de l'enfant.

### **Prise en charge des apnées du prématuré**

Les apnées du prématuré les moins sévères peuvent être prévenues en évitant les facteurs déclenchants ou stoppées par stimulation cutanée douce. Pour traiter les apnées du prématuré plus sévères, les néonatalogistes utilisent deux traitements qui ont prouvé leur efficacité depuis plus de 40 ans. Le premier traitement, la caféine (Schmidt et al., 2006), une méthylxanthine qui va agir en bloquant les récepteurs de l'adénosine  $A_1$  et  $A_2$ , ce qui va augmenter la dégradation de l'ATP (adénosine triphosphate) en AMPc (adénosine monophosphate cyclique); la concentration plus élevée d'AMPc stimule alors les centres cardiorespiratoires au niveau du bulbe rachidien (Abu-Shaweesh et al., 2008). Le second traitement, la pression positive continue nasale (PPCN) est un support ventilatoire non invasif qui permet une respiration spontanée chez le nouveau-né et le nourrisson. L'application d'une pression positive continue nasale au niveau des voies aériennes supérieures (VAS) via une interface (ex : masque nasal, lunettes d'oxygénothérapie nasales, masque facial, canules intranasales) diminue la résistance des VAS en les dilatant et améliore

l'oxygénation pulmonaire en augmentant la capacité résiduelle fonctionnelle (CRF) (Dibiasi, 2009).

### **Contexte de l'étude**

Après une revue de la littérature et selon nos connaissances actuelles, deux études ont rapporté l'effet des xanthines sur les événements cardiorespiratoires induits par les CRL. Il s'agit d'observations de portée très limitée effectuées lors d'expérimentation dont l'objectif était autre que l'étude de l'effet des xanthines (Lee et al., 1977; St-Hilaire et al., 2007). La première a été effectuée sur 4 porcelets nouveau-nés à terme et la seconde sur 3 agneaux prématurés. Ces deux études ont constaté que l'administration préalable d'une xanthine (aminophylline ou caféine) entraînait une atténuation voire un arrêt des manifestations cardiorespiratoires induites par les CRL. L'étude effectuée dans notre laboratoire (St-Hilaire et al., 2007) a mis en évidence lors d'induction de CRL avec différentes solutions (eau, salin et HCl) une amélioration du pourcentage de diminution de la fréquence cardiaque et de la durée des apnées chez 3 agneaux qui avaient reçu de la caféine durant les premiers jours de vie pour des apnées-bradycardies sévères.

Devant l'absence de preuve formelle et vue le nombre réduit d'animaux dans les deux études, nous avons voulu vérifier les constations de ces effets bénéfiques des xanthines sur les événements cardiorespiratoires induits par les CRL.

Mon projet de maîtrise s'est donc fixé deux objectifs :

-l'objectif principal est celui d'évaluer les effets de la caféine et/ou de la PPCN sur les événements cardiorespiratoires survenant lors des CRL chez les agneaux prématurés.

-l'objectif secondaire est celui d'améliorer le modèle d'agneau prématuré. Un taux de mortalité de 50% sur notre précédent modèle malgré une prise en charge intensive a rendu impératif cet objectif.

Ce modèle animal est probablement le meilleur qui existe actuellement pour l'étude du contrôle respiratoire chez le prématuré par les similitudes respiratoires et pondérale qu'il offre avec le nouveau-né humain sans recours à une sédation préalable (St-Hilaire et al., 2007). Propice à l'étude des événements cardiorespiratoire du prématuré dans diverses conditions expérimentales, ce modèle permettra la compréhension des mécanismes impliqués dans les apnées et bradycardies du prématuré humain et par conséquent une prise en charge thérapeutique adaptée.

## AVANT PROPOS DE L'ARTICLE

**Titre:** Effect of Caffeine and/or Nasal CPAP Treatment on Laryngeal Chemoreflexes in preterm lambs

**Auteurs :** Nadia Boudaa, Nathalie Samson, Vincent Carrière, Pamela Samanta Germim, Aida Bairam, Jean-Paul Praud.

**Statut de l'article :** Soumis à « Journal of Applied Physiology » le 14 mai 2012.

**Contribution des auteurs :** Les expériences, les analyses, la revue de la littérature et la rédaction de l'article ont été effectuées majoritairement par moi sous la supervision et l'aide de mon directeur de recherche, de Nathalie Samson pour l'ensemble de mon projet ainsi que l'aide de Vincent Carrière pour certaines analyses.

Certaines modifications ont été effectuées dans l'article à la demande des membres du jury, ces dernières n'engagent que ma responsabilité.

## RÉSUMÉ EN FRANÇAIS DE L'ARTICLE

Les connaissances actuelles suggèrent que les Chémoréflexes laryngés (CRL) sont impliqués dans la survenue de certaines apnées néonatales ou bradycardies, surtout chez le nouveau-né prématuré. Bien que la caféine et / ou la pression positive continue nasale (PPCN) soient des traitements fréquemment utilisés pour les apnées du prématuré, leurs effets sur les apnées ou bradycardies liées aux CRL sont pratiquement inconnus. Le but de la présente étude était de tester l'hypothèse que la caféine et / ou la PPCN diminuaient l'inhibition cardiorespiratoire liée aux CRL chez un modèle ovin prématuré. Sept agneaux sont nés prématuré à 133 jour de gestation par voie vaginale (gestation normale: 147 jours) après des injections intramusculaires de bétaméthasone et de mifépristone. Cinq jours après la naissance, une instrumentation chirurgicale chronique a été réalisée pour enregistrer les états de conscience, l'électrocardiogramme, la pression artérielle systémique, l'activité électromyographique du muscle constricteur laryngé et un cathéter supraglottique pour induire les CRL durant le sommeil calme dans 4 conditions randomisées: 1) contrôle (sans caféine ou PPCN), 2) PPCN (5 cm H<sub>2</sub>O, sans caféine); 3) de la caféine (10mg/kg IV perfusé en 30 minutes, sans PPCN) et 4) PPCN + caféine. Alors que la PPCN a constamment diminué les apnées / bradycardies, l'effet de la caféine était inconstant et pas significatif. Par ailleurs, l'effet de la caféine + PPCN était moins bénéfique que la PPCN seule. En conclusion, nos résultats uniques montrent que contrairement à la caféine, la PPCN améliore constamment l'inhibition cardiorespiratoire liée aux CRL chez les agneaux prématurés. Au-delà de leur signification physiologique, nos résultats suggèrent que la PPCN peut être supérieure à la caféine pour le traitement des apnées néonatales liées aux CRL.

## ARTICLE

# EFFECTS OF CAFFEINE AND/OR NASAL CPAP TREATMENT ON LARYNGEAL CHEMOREFLEXES IN PRETERM LAMBS

Nadia Boudaa†, Nathalie Samson†, Vincent Carrière†, Pamela Samanta  
Germim†, Jean-Charles Pasquier□, Aida Bairam\*, Jean-Paul Praud†

† Neonatal Respiratory Research Unit, Departments of Pediatrics and Physiology;  
Université de Sherbrooke, QC, Canada – J1H 5N4

\* Department of Pediatrics, Université Laval, Centre de Recherche (D0-711),  
Hôpital St.-François d'Assise, Quebec, QC, G1L 3L5

□ Department of Obstetrics and Gynecology, Université de Sherbrooke

**Short title:** Caffeine, nasal CPAP and laryngeal chemoreflexes

**Address for correspondence and proofs:**

Jean-Paul Praud MD PhD  
Departments of Pediatrics and Physiology  
Université de Sherbrooke  
J1H 5N4, QC Canada

Phone: (819) 346-1110, ext 14851  
Fax: (819) 564-5215  
email: Jean-Paul.Praud@USherbrooke.ca



## ABSTRACT

Current knowledge suggests that laryngeal chemoreflexes (LCR) are involved in the occurrence of certain neonatal apneas/bradycardias, especially in the preterm newborn. While caffeine and/or nasal continuous positive airway pressure (nCPAP) are the most frequent options used for treating apneas in preterm newborns, their effects on LCR-related apneas/bradycardias are virtually unknown. The aim of the present study was to test the hypothesis that caffeine and/or nCPAP decreases LCR-related cardiorespiratory inhibition in a preterm ovine model. Seven preterm lambs were born vaginally on gestational day 133 (normal gestation: 147 days) after intramuscular injections of betamethasone and mifepristone. Five days after birth, a chronic surgical instrumentation was performed to record states of alertness, electrocardiogram, systemic arterial pressure and electromyographic activity of a laryngeal constrictor muscle as well as to insert a transcutaneous, supraglottal catheter. Laryngeal chemoreflexes were induced in quiet sleep during 4 randomized conditions: 1) control (without caffeine or nCPAP); 2) nCPAP (5 cm H<sub>2</sub>O, without caffeine); 3) caffeine (10mg/kg infused intravenously in 30 minutes, without nCPAP); and 4) nCPAP + caffeine. While nCPAP consistently blunted the LCR-related apneas/bradycardias, the effect of caffeine was inconsistent and on average not significant. In addition, the effect of caffeine + nCPAP was less beneficial than nCPAP alone. In conclusion, our unique results show that, contrary to caffeine, nCPAP consistently improves LCR-related cardiorespiratory inhibition in preterm lambs. Beyond their potential physiological significance, our results suggest that nCPAP may be superior to caffeine for treating neonatal apneas linked to LCR.

**KEYWORDS:** Quiet sleep; apneas of prematurity; mifepristone; swallowing; arousal response

## INTRODUCTION

Laryngeal chemoreflexes (LCR) are a group of reflexes triggered by the contact between a liquid and the laryngeal mucosa and are primarily aimed at preventing tracheal aspiration (29, 39). In a mature mammal, including in the healthy full-term newborn, LCR include cough, deglutition and arousal (37). However, in the immature newborn mammal such as the preterm lamb, LCR rather encompass significant and, at times, life-threatening apneas, bradycardias and desaturations (38); treatment is currently unknown. Relevance for the study of LCR pertains to their likely involvement in neonatal pathologies linked to abnormalities of cardiorespiratory control, such as apneas of prematurity (AOP) (29, 39).

Apneas of prematurity represent a very frequent and worrisome pathology, which affects 50% of all newborns before 37 weeks of gestation and virtually all extremely premature infants born before 28 weeks of gestation (40). Though a number of AOP can be prevented by either avoiding triggers or prone positioning or can be halted by gentle cutaneous stimulations, further treatment is often needed (28). Caffeine and nasal CPAP (nCPAP) undoubtedly represent the mainstay of treatment for severe AOP. However, additional intervention in the form of nasal or even endotracheal intermittent positive pressure ventilation is sometimes necessary (42). Apneas of prematurity have a complex physiopathology, mainly related to immaturity of respiratory control (24). And while immature respiratory reflexes such as LCR are involved in some AOP in response to triggers such as laryngeal penetration of upper airway secretions or gastric refluxate or during milk or vitamin ingestion (29, 39), the effects of caffeine and/or nCPAP on LCR-related cardiorespiratory events are virtually unknown. Very preliminary results on the effect of caffeine administered in a non-controlled manner in 3 preterm lambs suggested that caffeine prevents severe LCR-related cardiorespiratory events (38). The aim of the present study performed in our unique ovine preterm model was therefore to test the hypothesis that caffeine and/or nCPAP can prevent LCR-related cardiorespiratory events.

## MATERIAL AND METHODS

### Animals

Experiments were performed in seven preterm lambs with a postconceptional age of 133 days (normal gestation: 147 days) and a mean birth weight of 3.11 kg (SD 0.61) (range: 2.14-4.24 kg). The protocol of the study was approved by the Ethics Committee for Animal Care and Experimentation of the Université de Sherbrooke.

### Preterm lamb model

Seven preterm lambs were born vaginally on gestational day 133. An ultrasound to confirm pregnancy, as well as the number of lambs and their viability was performed a few days prior to induction of premature labor in all ewes. To induce premature labor, ewes first received two intramuscular injections of 12 mg betamethasone on gestational days 131 and 132 to stimulate lung surfactant maturation (11). Secondly, on gestational day 132, an intramuscular injection of mifepristone (RU 486, a progesterone receptor antagonist, 8 mg/kg) was administered to all ewes (15). Thereafter, ewe behavior was carefully monitored by video surveillance, followed by one or more vaginal examinations until lambing. Lambing occurred on average 30 hours (SD 3) (range: 26 - 36h) after mifepristone injection. Delivery was only assisted in case of dystocia to prevent fetal neurological distress. During the first 48h following birth, vital signs, including temperature, heart and respiratory rate, oxygen saturation, blood glucose level and weight were meticulously monitored. If needed to maintain normal vital signs, lambs were placed under a heated lamp, received reconstituted ewe's colostrum or milk by bottle or feeding tube. The presence of an experimenter 24h/24 during the first 48h was deemed necessary to perform these vital tasks, as well as for assisting the preterm lamb in its attempts at successful interactions with its mother.

### **Chronic Instrumentation**

Chronic instrumentation was performed on the 5th day of life under general anesthesia (2% isoflurane, 30% N<sub>2</sub>O, balance O<sub>2</sub>), as recently described (8). Briefly, anesthesia was preceded by an intramuscular injection of ketamine (5 mg/kg), atropine sulfate (0.1 mg/kg) and morphine (0.016 ml/kg) and an intravenous bolus (10 ml/kg) of Ringer's lactate solution. One dose of ketoprofen (3 mg/kg) was also injected intramuscularly for analgesia and repeated if needed the next day. Antibiotics (5 mg/kg gentamicin and 50 mg ampicillin, twice a day) were administered intramuscularly prior to surgery and daily thereafter.

As previously described (8), two right-angled needle-electrodes (E7-12, Grass Technologies, West Warwick, RI, USA) were inserted into the parietal cortex directly through the skull for electrocorticogram (ECoG) recordings, while a third needle-electrode (F-E2M, Grass Technologies) was inserted under the scalp as a ground. Eye movements (EOG) were recorded with two custom-built silver electrodes inserted subcutaneously next to the right eye socket. The electrocardiogram (ECG) was recorded with 2 needle-electrodes (F-E2M, Grass Technologies) inserted under the periosteum of the 5<sup>th</sup> rib, on both sides of the thorax, and directly glued on the ribs. For electrical activity (EMG) recording, custom-designed bipolar electrodes, built from right-angled gold connectors (Sullins Connector Solution, Digi-Key Corporation, Thief River Falls, MN, USA), were inserted into both thyroarytenoid muscles (TA; a glottal constrictor) through the lateral aspect of the thyroid cartilage. Both electrodes were then glued on the external surface of the thyroid cartilage. A catheter was also introduced into the right carotid artery to monitor arterial blood pressure and blood gases. In addition, a supraglottal catheter was inserted transcutaneously to allow injection of liquids into the laryngeal vestibule (13). Finally, a plastic tubing (internal diameter 1 mm) was subcutaneously tunneled to the lamb's back in order to connect the external part of the supraglottal catheter to our custom-built, radio telemetry-driven injector. Leads from each electrode and catheter were

subcutaneously tunneled to a common exit on the lamb's back. Post-operative care included antibiotics and daily flushing of the arterial catheter with heparin solution. Lambs were euthanized at the end of experiments by pentobarbital overdose (100 mg/kg). Correct electrode and catheter positioning was systematically verified at necropsy.

## **Experimental equipment**

### **Ventilatory equipment**

Nasal CPAP was applied using the Infant Flow nCPAP system (Cardinal Health, Dublin, OH, USA) with heated (37°C), humidified air. A custom-built nasal mask, filled with dental paste (Examix, Servident, St-Laurent, Qc, CAN), was installed on the lamb's muzzle to deliver nCPAP while enabling the lamb to open its mouth at will (5).

### **Recording equipment**

Lamb instrumentation was completed immediately before recordings. Elastic bands for respiratory inductance plethysmography (Respirace, NIMS, Miami Beach, FL, USA) were installed around the thorax and abdomen to monitor respiratory movements and to assess lung volume variations qualitatively. Nasal CPAP values were continuously monitored from the nasal mask (RX104A pressure transducer, Biopac Systems, Goleta, CA, USA). A reflectance pulse oximeter sensor (Masimo Radical, Irvine, CA, USA) was attached at the base of the tail for continuous monitoring of oxygen hemoglobin saturation ( $SpO_2$ ) as well as pulse wave. Arterial blood gases were also measured in four lambs (IL 1306, Instrumentation Laboratory, Lexington, MA, USA) and corrected for rectal temperature of the lamb (1). Finally, the subcutaneous plastic tubing connected to the supraglottal catheter was attached to a custom-built, radio telemetry-driven injector, where liquids to be injected were warmed and maintained at the lamb's body temperature. All recordings were performed using our custom-designed radio telemetry system (33) in order to obtain prolonged recordings in non-

sedated lambs under the least possible restraining conditions. The raw EMG signals were rectified, integrated, and moving time averaged (100 ms). All parameters were continuously recorded on a PC using AcqKnowledge software (version 4.1; Biopac Systems, Goleta, CA, USA).

### **Design of the study**

All preterm lambs were housed and cared for with their mother in our animal quarters until the experimental day. Polysomnographic recordings were performed on postnatal days 7 and 8 ( $n = 5$ ) or postnatal days 8 and 9 ( $n = 2$ ) and included simultaneous recording of respiratory movements, states of alertness, TA EMG, ECG, systemic arterial blood pressure and  $SpO_2$ . Accordingly, lambs were placed in a Plexiglas chamber (1.2 x 1.2 x 1m, corresponding to guidelines from the Canadian Council for Animal Care) and comfortably positioned on a mattress with minimal contention (under the constant presence of an experimenter near the lamb to prevent agitation and ambulation when it was connected to nCPAP). Arterial blood gases and pH were measured in four lambs before each of the four experimental conditions in order to eliminate the presence of baseline hypoxia, hypercapnia and/or a low pH, which have been shown to affect LCR (17, 18). Laryngeal chemoreflexes were induced by injection of 0.5 ml of hydrochloric acid (HCl, pH = 2, diluted in saline, osmolarity = 295 mosM/L) or ewe milk via the supraglottal catheter during quiet sleep (QS). Both solutions were injected twice in random order during four experimental conditions: 1) control (without caffeine or nCPAP); 2) nCPAP (5 cm  $H_2O$ , without caffeine; 3) caffeine (10mg/kg infused intravenously in 30 minutes, without nCPAP); and 4) nCPAP + caffeine. Due to the long half-life of caffeine in the newborn (2), the two experimental conditions involving caffeine had to be performed on the second recording day. On each day, the order of the 2 experimental conditions (with and without nCPAP) was randomized. The supraglottal catheter was systematically flushed with 1 ml of saline between each injection of test solutions (dead space of the catheter 0.5 ml) and each lamb was

given at least 15 min of recovery time between two injections. Events such as agitation, cough, arousal and/or full awakening were noted by an observer throughout the recordings. Finally, plasma caffeine level was systematically measured at the end of the second recording day.

## **Data analysis**

### **States of alertness**

Standard electrophysiological and behavioral criteria were used to define quiet sleep (QS) (31). Cortical arousal from QS was defined by the association of a change in ECoG (decrease in amplitude + increase in frequency) for 3 s or more, with at least two of the following modifications: a 10% increase in heart rate (HR) or change in respiratory rate (RR) or movement (21). Full awakening was defined when the lamb was still awake after 1 min (16).

### **Laryngeal chemoreflexes**

Analysis of the LCR was performed as described previously within the first minute following each laryngeal injection (38). First, cardiorespiratory responses were assessed as follows. The percentage of decrease in HR [%Dec HR =  $(HR_{BL} - HR_{min}) \times 100 / HR_{BL}$ ] was calculated, with  $HR_{BL}$  representing the baseline HR value averaged over 30 s before challenge, and  $HR_{min}$  representing the minimal HR value observed during the first minute after the challenge. The %Dec  $SpO_2$  was calculated in the same manner. Any presence of bradycardia (defined by a %Dec HR > 33%) was noted, as well as the number of bradycardias and total summed duration of bradycardias. The presence of apneas (defined as at least two missed breaths relative to baseline breathing) was also noted, including the number of apneas and their total summed duration. Moreover, any presence of desaturation was noted, as defined by a decrease in  $SpO_2$  of at least 4% or < 90%, as well as the minimal  $SpO_2$  ( $SpO_{2min}$ ). The percentage of increase (%Inc) in MAP (Mean arterial pressure) %Inc MAP =  $[(MAP_{max} - MAP_{BL}) \times 100 / MAP_{BL}]$

was also calculated, with  $MAP_{max}$  being the maximal MAP value observed during the first minute after the challenge. For all stimulations, the time duration between the moment of stimulation and the moment of  $HR_{min}$ , the onset of the first apnea,  $SpO_{2min}$  and MAP occurrence (respectively  $HR_{min}$ , apnea,  $SpO_{2min}$  and MAP occurrence times) were measured. In addition to cardiorespiratory responses, the following responses, usually considered to be protective against tracheal aspiration (29), were assessed. First, the number of swallows (defined as a brisk, high-amplitude, and short-duration TA EMG burst) (30) occurring within the first minute after laryngeal stimulation was tallied. Secondly, the number of coughs (including laryngeal expiratory reflexes, which could not be discerned from coughs in our study) was also inferred from visual observations, as well as analysis of TA EMG and respiratory inductance plethysmograph signals. Lastly, the presence of arousal or full awakening was noted.

### **Statistical analysis**

Results were first averaged in each lamb and then averaged for the 7 lambs as a whole. Quantitative data were expressed as mean (SD), whereas qualitative binary data (arousal and awakening, yes/no) were expressed as relative frequency. Statistical data analyses were performed on raw data for all variables. Quantitative continuous data were analyzed through a general linear model 2-way ANOVA for repeated measures using PROC MIXED of the SAS software (version 9.1, Cary, NC), with treatment (nCPAP and/or caffeine) and solutions (HCl or ewe milk) as the independent variables. Binary data were analyzed with a logistic regression model using the GENMOD procedure of the SAS software while count data (number of coughs, swallows) were analyzed by the Friedman's test followed by the Wilcoxon's signed rank test, using the GraphPad Prism software (version 5.0, La Jolla, CA).

Differences were deemed statistically significant if  $p < 0.05$ . In addition, given the relatively small number of studied lambs (related both to the complexity of the



preterm ovine model and ethical constraints), we also considered the presence of a significant trend, defined as  $p < 0.1$  in the interpretation of the results.

## RESULTS

### Premature lamb model

Seven pregnant ewes were included in the study. Lambing occurred on average 30 (3) hours (range 26 - 36 h) after mifepristone injection, on gestational day 133. The total number of births was 12, including 6 females and 6 males with 5 ewes delivering twins and 2 ewes delivering a single lamb. Eleven of the twelve preterm lambs survived, with two lambs from the same litter needing resuscitation at birth due to severe dystocia. One of these twins was stillborn and could not be resuscitated. One lamb was found cyanotic and bradycardic 24h after birth (probably following a prolonged apnea of prematurity secondary to respiratory control immaturity) , but was successfully resuscitated. All the other lambs did not require oxygen at birth and presented normal vital signs from birth to the last day of experimentation (Table 1). Lamb feeding initially began by presentation of the ewe's teat for a maximum of 5 minutes at approximately every 2 hours and was followed, if needed, by supplemented bottle-feeding (ewe colostrum or milk). Two lambs were tube-fed during the first 24 hours of life due to a poor sucking reflex. All lambs were self-sufficient in feeding after 24 to 48 hours of life.

**Table 1: Mean baseline vital signs of the 7 preterm lambs during room air breathing from birth to the last day of experimentation**

<b>Vital signs</b>	<b>Values</b>
Heart rate (beats/min)	225 (7)
Respiratory rate (breaths/min)	69 (5)
Hemoglobin O <sub>2</sub> saturation (%)	97 (0.5)
Body temperature (°C)	39.9 (0.1)
Glucose (mmol/l)	5.7 (2.4)
Mean weight gain/day (g)	227 (72)

Values are expressed as mean (standard deviation)

## **Effects of nCPAP and/or caffeine treatment**

### **Baseline cardiorespiratory values**

Baseline cardiorespiratory values obtained in all 7 lambs and in each experimental condition are detailed in Table 2. Overall, nCPAP alone or combined with caffeine decreased RR and increased MAP as well as SpO<sub>2</sub> (see Table 2 for details on specific interactions). In addition, baseline arterial blood gases and pH measured in 4/7 lambs were found normal in all experimental conditions: PaO<sub>2</sub> = 80 (4) mmHg (range 76-88 mmHg); PaCO<sub>2</sub> = 41 (2) mmHg (range 39-45 mmHg); pH = 7.36 (0.01) (range 7.34-7.37).

**Table 2 : Influence of nCPAP and/or caffeine treatment on baseline cardiorespiratory values during quiet sleep in 7 preterm lambs**

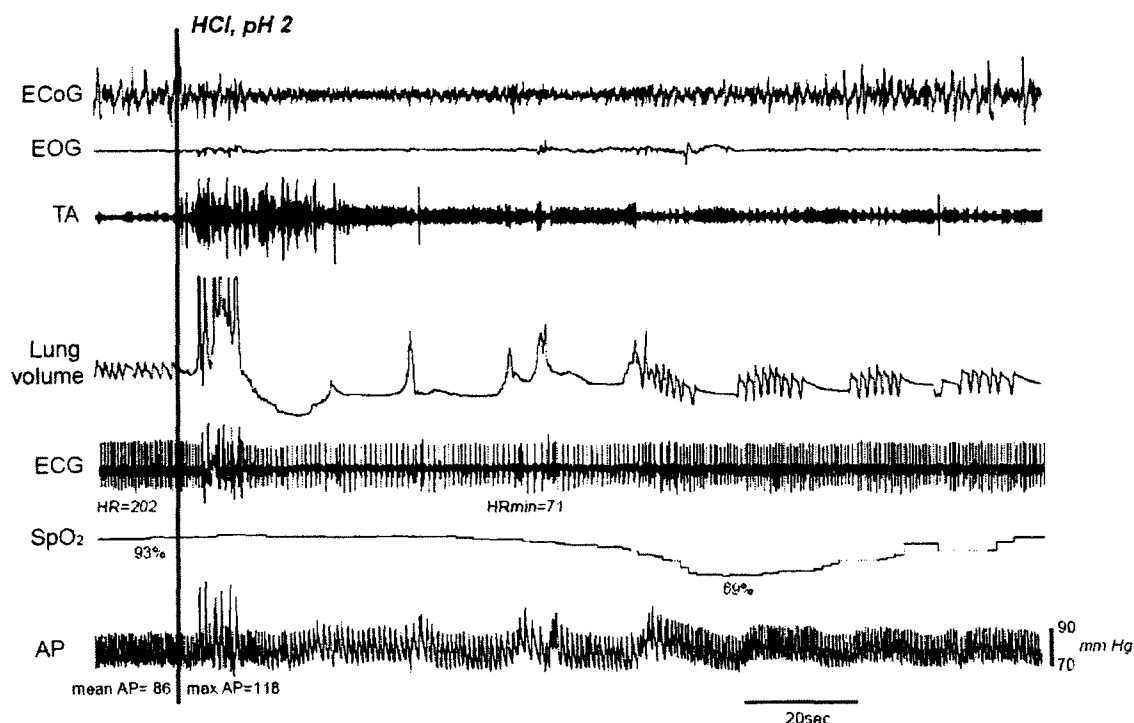
<b>Baseline values</b>	<b>Control</b>	<b>nCPAP</b>	<b>Caffeine</b>	<b>nCPAP + caffeine</b>
Heart rate (beats/min)	207 (26)	221 (20)	211 (29)	211 (23)
Respiratory rate (breaths/min)	60 (19)	52 (18) <sup>a,b</sup>	61 (17)	55 (17) <sup>b</sup>
Mean arterial pressure (mmHg)	73 (8)	84 (14) <sup>a,b</sup>	73 (9)	78 (11) <sup>a</sup>
Hemoglobin O <sub>2</sub> saturation (%)	94 (2)	96 (1) <sup>a</sup>	94 (3)	96 (1) <sup>a,b</sup>

Values are expressed as means (SD). Bold exponents indicate  $P < 0.05$ , normal font exponents indicate  $P < 0.1$ . All other  $P$  values /are greater than 0.1. <sup>a</sup>: vs. control, <sup>b</sup>: vs. caffeine.

### Laryngeal chemoreflexes

A total of 111 laryngeal stimulations were performed during QS; one LCR (milk) was not induced as one caffeine-treated lamb was unable to sleep during the recording. Plasma caffeine level in the 7 lambs was 58 (6) mg/L (range 35-67 mg/L) after completion of the second recording session, approximately 4 hours after caffeine infusion.

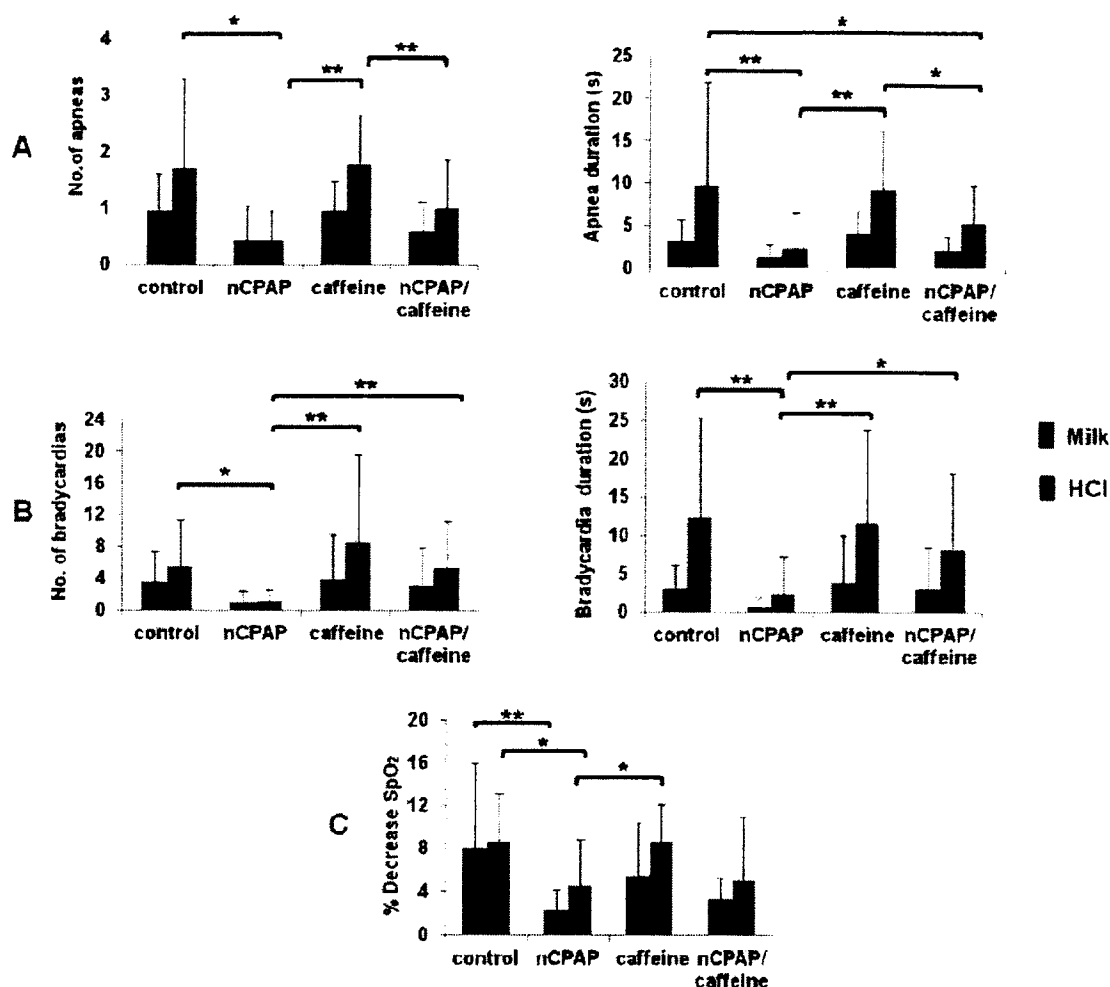
Life-threatening cardiorespiratory events were observed in 3/7 lambs following HCl injection in control, caffeine and nCPAP/caffeine conditions. These events included repetitive, prolonged central apneas or periodic breathing epochs with bradycardias (minimum HR 32 beats/min) and hemoglobin desaturation (minimum SpO<sub>2</sub> = 20%). The events lasted from 95 sec to 9 min before spontaneous recovery (Fig. 1). No severe cardiorespiratory event was observed under nCPAP condition in any of the lambs.



**Figure 1** Potentially life-threatening cardiorespiratory reflexes triggered in one preterm lamb following instillation of 0.5 ml HCl onto the laryngeal mucosa during quiet sleep in control condition (no nCPAP / no caffeine).

From top to bottom: ECoG, electrocorticogram; EOG, electrooculogram; TA, electrical activity of the thyroarytenoid muscle (laryngeal constrictor); Lung volume, sum signal of the respiratory inductance plethysmograph, allowing qualitative measurement of respiration (inspiration upward); ECG, electrocardiogram; HR, heart rate (mean and maximum (max); beats/min); SpO<sub>2</sub>, hemoglobin O<sub>2</sub> saturation; AP, arterial pressure (mean and maximum (max); mmHg). Note the prolonged, potentially life-threatening responses with awakening, repetitive apneas followed by periodic breathing, severe bradycardia down to 71 beats/min, and severe hemoglobin O<sub>2</sub> desaturation down to 69%.

***Laryngeal chemoreflexes-related cardiorespiratory events.*** Cardiorespiratory events obtained during LCR are summarized in Figure 2 and Table 3, and are illustrated by tracings obtained in one lamb in the 4 experimental conditions in Figure 3. SpO<sub>2</sub> was analyzed in only 5 lambs due to technical difficulties (one black lamb, hence the reflectance sensor unable to analyze blood color, and one lamb with its tail severely bitten by the ewe). Overall, nCPAP significantly blunted the LCR-related cardiorespiratory components elicited by HCl compared to control and to caffeine treatment. A beneficial effect of nCPAP treatment was observed for apnea number and/or duration, as well as for bradycardia number and/or duration and for the %Dec HR. In addition, minimal HR and SpO<sub>2</sub> values were higher during nCPAP treatment (see Table 3 for details on specific interactions). Although cardiorespiratory inhibition was less pronounced following milk injection, it was similarly blunted under nCPAP treatment compared to control and caffeine treatment (Table 3). By contrast, caffeine alone or when combined with nCPAP had no significant effect, on average, on LCR-related cardiorespiratory inhibition. Further analysis revealed that, contrary to nCPAP, the effect of caffeine was notably variable from one lamb to another for apnea number and/or duration (Fig. 4A), as well as for bradycardia number and/or duration for both HCl (Fig. 4B) and milk.



**Figure 2** Effect of nCPAP and/or caffeine treatment on A: apnea number and duration; B: bradycardia number and duration; C: the % decrease in SpO<sub>2</sub>, following instillation of 0.5 ml of milk (black column) and HCl (gray column) onto the laryngeal mucosa during quiet sleep. Values are expressed as means (standard deviation). \*\*P < 0.05; \*P<0.1.

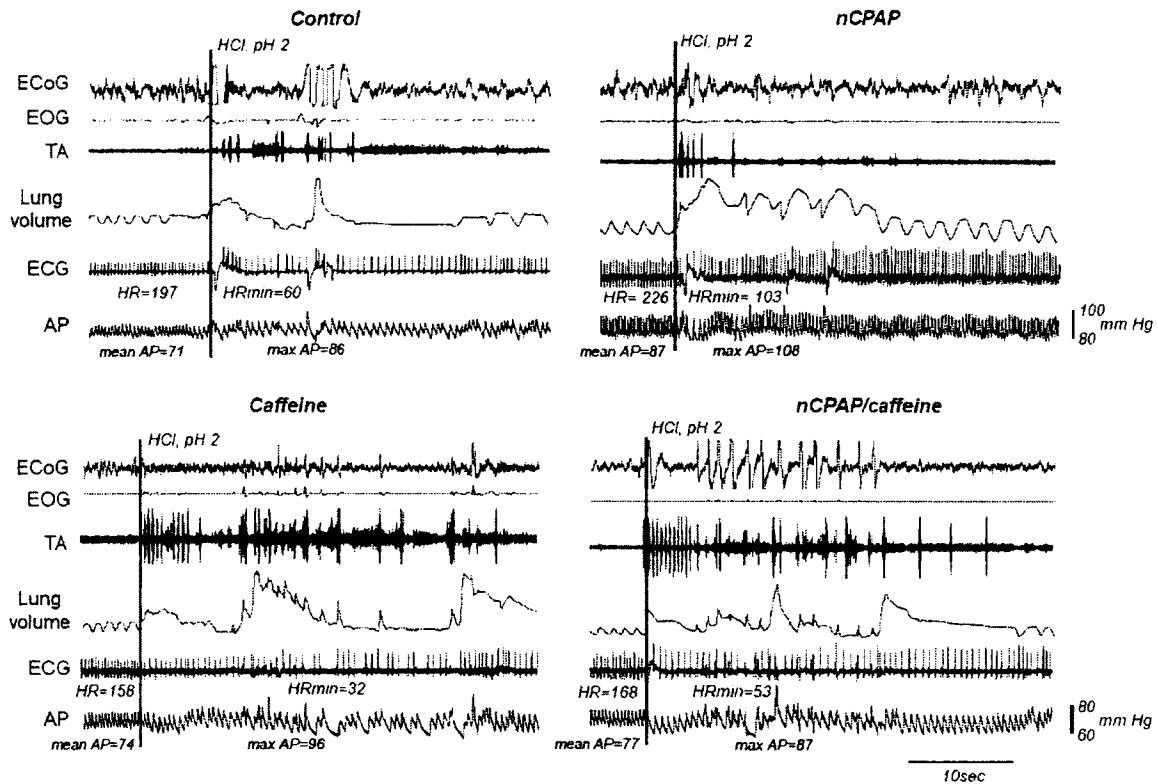
Apnea and bradycardia duration represents the sum of duration of all LCR-related apneas or bradycardias observed.



**Table 3 : Effects of nCPAP and/or caffeine treatment on the cardiorespiratory components of LCR during quiet sleep in 7 preterm lambs**

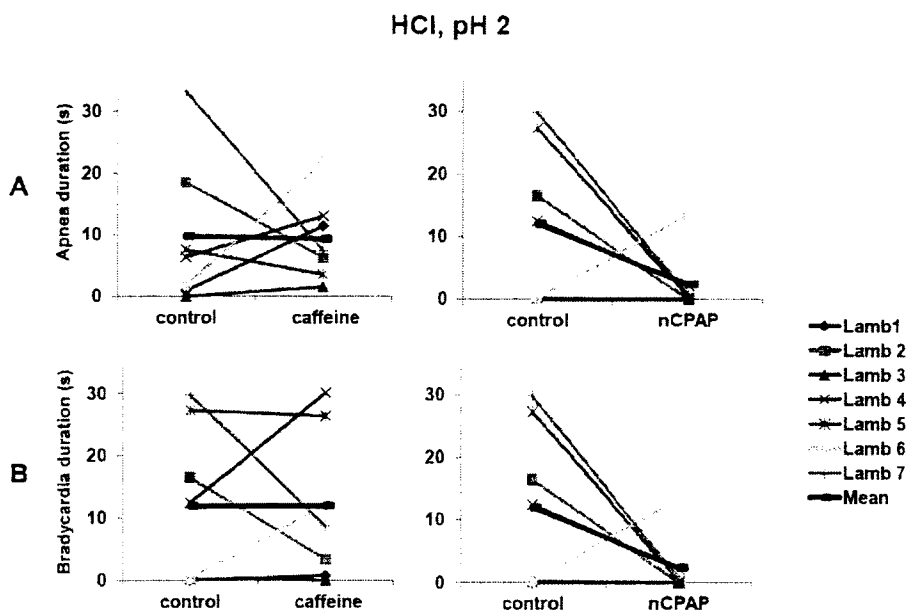
	<b>Control</b>		<b>nCPAP</b>		<b>Caffeine</b>		<b>nCPAP + caffeine</b>	
	<b><i>Milk</i></b>	<b><i>HCI</i></b>	<b><i>Milk</i></b>	<b><i>HCI</i></b>	<b><i>Milk</i></b>	<b><i>HCI</i></b>	<b><i>Milk</i></b>	<b><i>HCI</i></b>
% Decrease HR	38 (18)	44 (22)	30 (14) <sup>b,c</sup>	35 (15) <sup>a,b</sup>	42 (16)	50 (19)	39 (21)	39 (21) <sup>b</sup>
Minimal HR, beats/min <sup>-1</sup>	126 (38)	121 (53)	152 (32) <sup>a,b</sup>	145 (34) <sup>a,b</sup>	122 (40)	105 (51)	132 (54)	128 (43) <sup>b</sup>
HR <sub>min</sub> occurrence time, s	11 (8)	20 (14)	8 (6)	12 (10)	7 (3)	20 (13)	13 (10)	18 (11)
Apnea occurrence time, s	4 (5)	14 (12)	3 (5)	24 (25)	7 (7)	15 (9)	10 (13)	18 (12)
SpO <sub>2min</sub>	87 (7)	87 (5)	94 (3) <sup>a,b</sup>	92 (5) <sup>a,b</sup>	89 (6)	87 (4) <sup>c</sup>	92 (3) <sup>a</sup>	91 (7) <sup>a</sup>
SpO <sub>2min</sub> occurrence time, s	27 (15)	29 (15)	19 (7)	22 (8) <sup>b</sup>	19 (5)	37 (10)	18 (2) <sup>a</sup>	20 (9) <sup>b</sup>

Variables are expressed as means (SD). HR, heart rate; HR<sub>min</sub>, minimal heart rate; SpO<sub>2</sub>, hemoglobin O<sub>2</sub> saturation; SpO<sub>2min</sub>, minimal hemoglobin O<sub>2</sub> saturation. a: vs. control, b: vs. caffeine, c: vs. nCPAP/caffeine. Bold exponents indicate P < 0.05, normal font exponents indicate P < 0.1. All other P values are greater than 0.1.



**Figure 3** Cardiorespiratory reflexes triggered in one preterm lamb following instillation of 0.5 ml HCl onto the laryngeal mucosa during quiet sleep in the four conditions studied (control, nCPAP, caffeine, nCPAP + caffeine).

See abbreviations in figure 1. Arterial blood O<sub>2</sub> saturation could not be recorded because the lamb was black, hence blood color could not be analyzed by the reflectance pulse oximeter sensor. Note the severe LCR-related cardiorespiratory components with repetitive apneas, bradycardia and increased arterial pressure observed in control condition, as well as with caffeine and nCPAP + caffeine.



**Figure 4 Individual cardiorespiratory responses following instillation of 0.5ml HCl on A: apnea duration; B: bradycardia duration.**

Note the high variability of the effect of caffeine (left column) from one lamb to another, compared to the much more consistent effect of nasal CPAP (right column).

**Protective mechanisms observed during laryngeal chemoreflexes.** The protective mechanisms observed during LCR are summarized in Table 4. Overall, the %Inc MAP was decreased during nCPAP and nCPAP + caffeine treatment compared to control, independently of the solution used to induce the LCR. While no differences between treatments for either solutions were observed for awakening, a greater number of arousals was noted during nCPAP + caffeine treatment compared to control, following HCl injection only ( $p = 0.05$ ). Finally, while no differences between treatments were noted for the number of swallows, a greater number of coughs were observed after caffeine administration when compared to nCPAP alone or combined with caffeine following HCl injection only, whereas no differences were otherwise noted between treatments and control condition.

**Table 4 Effects of nCPAP and/or caffeine treatment on the protective mechanisms of LCR during quiet sleep in 7preterm lambs**

	Control		nCPAP		Caffeine		nCPAP + caffeine	
	<i>Milk</i>	<i>HCI</i>	<i>Milk</i>	<i>HCI</i>	<i>Milk</i>	<i>HCI</i>	<i>Milk</i>	<i>HCI</i>
%Increase MAP	21 (7)	21 (6)	12 (3) <sup>a,b</sup>	14 (4) <sup>a,b</sup>	26 (20)	22 (8)	16 (5) <sup>b</sup>	14 (6) <sup>a,b</sup>
MAP occurrence time, s	7 (3)	18(13)	10 (10)	11 (9) <sup>a,b,c</sup>	6 (3)	19 (8)	6 (1)	21 (12)
No. swallows	10 (5)	11(9)	9 (4)	9(6)	11 (5)	16 (13)	10 (3)	12 (6)
No. coughs	0.07 (0.1)	2(2)	0.3 (0.9)	1(1) <sup>b</sup>	1 (2)	5 (5)	0.2 (0.3)	2 (3) <sup>b</sup>
No. arousals	11/111	6/111	12/111	9/111	6/111	6/111	11/111	11/111 <sup>a</sup>
No. awakenings	0/111	4/111	0/111	2/111	4/111	6/111	0/111	1/111

Quantitative variables are expressed as means (SD) and qualitative variables (arousal and awakening) are expressed as relative frequency. MAP, mean arterial pressure; No. arousals, number of LCR with arousal/total number of LCR; No. awakenings, number of LCR with awakening/total number of LCR. <sup>a</sup>: vs. control, <sup>b</sup>: vs. caffeine, <sup>c</sup>: vs. nCPAP/caffeine. Bold exponents indicate  $P < 0.05$ , normal font exponents indicate  $P < 0.1$ . All other  $P$  values are greater than 0.1.

## **DISCUSSION**

### **Statement of principal findings**

The present study provides new and intriguing findings on the effects of nCPAP and/or caffeine on laryngeal chemoreflexes in preterm lambs. Indeed, nCPAP blunted LCR-related cardiorespiratory inhibition, contrary to caffeine alone or combined with nCPAP; minimal effects were noted on the so-called protective mechanisms such as swallowing, coughs, arousal responses and awakenings. Moreover, while the effects of nCPAP treatment on cardiorespiratory events were consistent in most lambs (6/7 lambs), the effect of caffeine was notably variable from one lamb to another.

### **Our preterm lamb model**

Over the years, many improvements have been made to our preterm lamb model, which has resulted in an important increase in the survival rate and health outcome of our animals (3, 30, 31, 38). Previously, intensive neonatal care, including delivery by caesarean section under epidural anesthesia, immediate endotracheal intubation at birth to deliver exogenous surfactant replacement, supplemental nasal oxygen and tube feeding, were applied, with an average survival rate of roughly 50% at day 7 of life (3, 30, 31, 38). In contrast, 11/12 preterm lambs delivered in the present study survived (one stillborn lamb due to severe dystocia) with constant care focusing on optimal ewe-lamb interactions during the first 48 hours of life while eliminating invasive procedures. This intensive, albeit non-invasive neonatal care probably explains our high survival rate (> 90%), which compares favorably to the rates recently reported by others for a similar preterm ovine model (9).

### **Effects of caffeine and/or nCPAP treatment on laryngeal chemoreflexes**

Caffeine is undoubtedly the first line treatment for severe AOP, due to both its general efficiency in reducing AOP and its relative short term and long term safety profile, including up to school-age (2, 25, 34, 35). Caffeine is both a powerful central nervous system stimulant and respiratory stimulant. The latter is partly related to its potent A1 and A2 adenosine receptor antagonist action and includes an increase in minute ventilation and CO<sub>2</sub> sensitivity as well as a decrease in hypoxic depression and periodic breathing (23). However, caffeine alone can be insufficient to treat AOP (6) and nCPAP (4-6 cmH<sub>2</sub>O) must often be added to caffeine for an optimal effect on AOP. Nasal CPAP functions by decreasing upper airway obstruction and work of breathing and by increasing functional residual capacity and pulmonary oxygen stores (10, 24, 42). However, although nCPAP and caffeine are widely used for AOP treatment, their effects on LCR-related apneas and bradycardias are still unknown.

### **Blunting of LCR-related cardiorespiratory inhibition by nCPAP**

Nasal CPAP increases laryngeal opening in preterm infants (14) and decreases non-nutritive swallowing frequency in newborn lambs (32). This could conceivably increase the contact time of liquid with the laryngeal mucosa and consequently enhance LCR-related cardiorespiratory inhibition. On the contrary, the present study reveals that an nCPAP of 5 cmH<sub>2</sub>O blunts LCR-related cardiorespiratory events and arterial oxygen desaturation in preterm lambs, as opposed to caffeine alone or combined with nCPAP. The increase in pulmonary oxygen stores under nCPAP likely contributed to preventing desaturations and bradycardias following LCR-related apneas (10, 24). However, the mechanism underlying the beneficial effects of nCPAP on apneas is unclear. In particular, nasal CPAP did not decrease swallowing activity, a well-known respiratory inhibitor.

### High variability of caffeine effects on LCR-related cardiorespiratory inhibition

Previous preliminary results in only 3 preterm lambs treated with caffeine (one intravenous infusion of 10 mg/kg) for clinically significant apneas and bradycardias, 3 days prior to LCR studies, led to the hypothesis that caffeine treatment was an efficient means to prevent LCR-related cardiorespiratory events (38). However, results from the present study show a very variable effect of caffeine, with a blunting of the LCR-related cardiorespiratory inhibition being observed in only 2/7 preterm lambs (figure 4). Such variable effect of caffeine has also been reported in preterm infants for AOP reduction (12, 19, 26), as well as a failure to prevent hypoxemic episodes and bradycardias (7). Of note, the variability in caffeine effect in preterm lambs was not related to a variable arousal and/or awakening response during LCR, since the latter did not differ between treatments.

### Protective mechanisms related to laryngeal chemoreflexes

Aside from cardiorespiratory events, laryngeal chemoreflexes also elicit coughing, swallowing, arousal and awakening. These components of the LCR are considered to be protective mechanisms aimed at both clearing liquids from the laryngeal region and preventing tracheal aspiration. The absence of effects of nCPAP on swallowing during LCR may appear surprising, given our previous report that non-nutritive swallowing is decreased by nCPAP via reflexes originating from bronchopulmonary receptors (32). However, our recent study showing that nCPAP (up to 10 cmH<sub>2</sub>O) does not decrease nutritive swallowing (5) likely indicates that the inhibiting effect of nCPAP on swallowing does not operate in instances of urgency, when repetitive swallowing is deemed crucial by the swallowing centers to prevent tracheal aspiration. To our knowledge, there have been no previous reports of the effect of caffeine on swallowing.

While in the present study, the administration of caffeine increased the number of coughs when compared to nCPAP alone or combined with caffeine, the precise

mechanism underlying this effect remains unclear. Finally, while the positive effect of nCPAP/caffeine on arousal may seem in agreement with the well-known neurostimulant effect of caffeine, including in human infants (4), the absence of any effect of caffeine alone remains unexplained.

### **Clinical implications**

The present results, although obtained in lambs, suggest that nCPAP treatment is especially relevant for AOP related to LCR, as observed in preterm infants with laryngeal penetration of upper airway secretions or gastric refluxate. However, among infants presenting with AOP, the proportion suffering from LCR-induced cardiorespiratory events is currently unknown (27, 36). In addition, two important questions need to be addressed and relate to the effects of nCPAP on the number and characteristics of gastric refluxes and on cardiorespiratory reflexes originating from esophageal receptors in instances of esophageal distension (20). Moreover, it is noteworthy that while nCPAP markedly reduces gastric reflux frequency in adult humans with obstructive sleep apneas (22), nCPAP has been shown to increase the gastroesophageal pressure gradient, and thus the risk of gastric refluxes, in adult rats (41).



## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors gratefully acknowledge the expert technical assistance of Jean-Philippe Gagné and the guidance of Julie Hamon and Nathalie Carrier for statistical analyses. The study was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research and the Foundation of Stars (Quebec) allocated to J-P Praud. Jean-Paul Praud is a member of the FRSQ-funded Clinical Research Center Étienne-Le Bel, Sherbrooke University Hospital, and the holder of the Tier 1 Canada Research Chair in Neonatal Respiratory Physiology.

### **Contributions of authors**

Nadia Boudaa: surgical instrumentation, postoperative animal care, recordings, analyses, manuscript writing

Nathalie Samson: design of the study, surgical instrumentation, recordings, interpreted results of experiments, manuscript writing

Vincent Carrière: analyses of the results

Pamela Samanta Germim: postoperative animal care

Jean-Charles Pasquier: design of the study

Aida Bairam: design of the study, manuscript writing

Jean-Paul Praud: design of the study, interpreted results of experiments, manuscript writing

## REFERENCES

1. **Andritsh RF, Muravchick S, Gold MI.** Temperature correction of arterial blood-gas parameters: A comparative review of methodology. *Anesthesiology* 55: 311-6, 1981.
2. **Aranda JV, Beharry K, Valencia GB, Natarajan G, Davis J.** Caffeine impact on neonatal morbidities. *J Matern Fetal Neonatal Med* 23(S3): 20-3, 2010.
3. **Arsenault J, Moreau-Bussiere F, Reix P, Niyonsenga T, Praud JP.** Postnatal maturation of vagal respiratory reflexes in preterm and full-term lambs. *J Appl Physiol* 94: 1978-86, 2003.
4. **Barry RJ, Clarke AR, Johnston SJ, Brouw CR, Bruggemann JM, Van Rijbroek.** Caffeine effects on resting state arousal in children. *Int J Psychophysiol* 73: 355-61, 2009.
5. **Bernier A, Catelin C, Hadj-Ahmed MA, Samson N, Bonneau P, Praud JP.** Effects of nasal continuous positive airway pressure on nutritive swallowing in lambs. *J Appl Physiol*, In press, 2012.
6. **Bhatt-Mehta V, Schumacher RE.** Treatment of apnea of prematurity. *Paediatr Drugs* 5: 195-210, 2003.
7. **Bucher HU, Duc G.** Does caffeine prevent hypoxaemic episodes in premature infants? A randomized controlled trial. *Eur J Pediatr* 147: 288-91, 1988.
8. **Carreau AM, Patural H, Samson N, Doueik AA, Hamon J, Fortier PH, Praud JP.** Effects of simulated reflux laryngitis on laryngeal chemoreflexes in newborn lambs. *J Appl Physiol* 111: 400-6, 2011.
9. **De Matteo R, Snibson K, Thompson B, Koumoundouros E, Harding R.** Lung function in developing lambs: is it affected by preterm birth? *J Appl Physiol* 107: 1083-8, 2009.
10. **Dibiasi RM.** Nasal continuous positive airway pressure (CPAP) for the respiratory care of the newborn infant. *Respir Care* 54: 1209-35, 2009.
11. **Eckman DM, Kerr BA, Fuloria M, Simandle SA, Watt SE, Rose JC, Figueroa JP.** Antenatal betamethasone alters vascular reactivity in adult female ovine cerebral arteries. *Pediatr Res* 68: 344-8, 2010.
12. **Erenberg A, Leff RD, Haack DG, Mosdell KW, Hicks GM, Wynne BA.** Caffeine citrate for the treatment of apnea of prematurity: a double-blind, placebo-controlled study. *Pharmacotherapy* 20: 644-52, 2000.
13. **Fortier PH, Reix P, Arsenault J, Dorion D, Praud JP.** Active upper airway closure during induced central apneas in lambs is complete at the laryngeal level only. *J Appl Physiol* 95: 97-103, 2003.
14. **Gaon P, Lee S, Hannan S, Ingram D, Milner AD.** Assessment of effect of nasal continuous positive pressure on laryngeal opening using fibre optic laryngoscopy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 80: F230-2, 1999.
15. **Gazal OS, Li Y, Schwabe C, Anderson LL.** Attenuation of antepartum relaxin surge and induction of parturition by antiprogesterone RU 486 in sheep. *J Reprod Fertility* 97: 233-40, 1993.

16. **Goto K, Mirmiran M, Adams MM, Longford RV, Baldwin RB, Boeddiker MA, Ariagno RL.** More awakening and heart rate variability during supine sleep in preterm infants. *Pediatrics* 103: 603-9, 1999.
17. **Heman-Ackah YD.** Determinants of fatal apnea responses to acid stimulation of the larynx in piglets. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 114: 509-16, 2005.
18. **Heman-Ackah YD, Pernell KJ, Goding GS Jr.** The laryngeal chemoreflex: an evaluation of the normoxic response. *Laryngoscope* 119: 370-9, 2009.
19. **Henderson-Smart DJ, De Paoli AG.** Methylxanthine treatment for apnoea in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* (12): CD000140, 2010.
20. **Jadcherla SR.** Upstream effect of esophageal distention: effect on airway. *Curr Gastroenterol Rep* 8:190-4, 2006.
21. **Kato I, Franco P, Groswasser J, Scaillet S, Kelmanson I, Togari H, Kahn A.** Incomplete arousal processes in infants who were victims of sudden death. *Am J Respir Crit Care Med* 168: 1298-303, 2003.
22. **Kerr P, Shoenut JP, Millar T, Buckle P, Kryger MH.** Nasal CPAP reduces gastroesophageal reflux in obstructive sleep apnea syndrome. *Chest* 101: 1539-44, 1992.
23. **Martin RJ, Abu-Shaweesh JM.** Control of breathing and neonatal apnea. *Biol Neonate* 87: 288-95, 2005.
24. **Mathew OP.** Apnea of prematurity: pathogenesis and management strategies. *J Perinatol* 31: 302-10, 2011.
25. **Mueni E, Opiyo N, English M.** Caffeine for the management of apnea in preterm infants. *Int Health* 1: 190-5, 2009.
26. **Paul K, Melichar J, Miletin J, Dittrichová J.** Differential diagnosis of apneas in preterm infants. *Eur J Pediatr* 168: 195-201, 2009.
27. **Poets CF.** Apnea of prematurity: What can observational studies tell us about pathophysiology? *Sleep Med* 11: 701-7, 2010.
28. **Poets CF.** Interventions for apnoea of prematurity; a personal view. *Acta Paediatr* 99: 172-7, 2010.
29. **Praud J-P.** Upper airway reflexes in response to gastric reflux. *Paediatr Respir Rev* 11: 208-12, 2010.
30. **Reix P, Fortier PH, Niyonsenga T, Arsenault J, Létourneau P, Praud JP.** Non-nutritive swallowing and respiration coordination in full-term newborn lambs. *Respir Physiol Neurobiol* 42: 209-18, 2003.
31. **Renolleau S, Letourneau P, Niyonsenga T, Praud JP.** Thyroarytenoid muscle electrical activity during spontaneous apneas in preterm lambs. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 1396-404, 1999.
32. **Samson N, Roy B, Ouimet A, Moreau-Bussière F, Dorion D, Mayer S, Praud JP.** Origins of the inhibiting effects of nasal CPAP on non-nutritive swallowing in newborn lambs. *J Appl Physiol* 105: 1083-90, 2008.
33. **Samson N, Dumont S, Specq ML, Praud JP.** Radiotelemetry devices to monitor breathing in non-sedated animals. *Resp Physiol Neurobiol* 179: 111-8, 2011.

34. **Schmidt B, Roberts RS, Davis P, Doyle LW, Barrington KJ, Ohlsson A, Solimano A, Tin W.** Caffeine for Apnea of Prematurity Trial Group. *N Engl J Med* 354: 2112-21, 2006.
35. **Schmidt B, Anderson PJ, Doyle LW, Dewey D, Grunau RE, Asztalos EV, Davis PG, Tin W, Moddemann D, Solimano A, Ohlsson A, Barrington KJ, Roberts RS.** Caffeine for Apnea of Prematurity (CAP) Trial Investigators. Survival without disability to age 5 years after neonatal caffeine therapy for apnea of prematurity. *JAMA* 307: 275-82, 2012.
36. **Slocum C, Hibbs AM, Martin RJ, Orenstein SR.** Infant apnea and gastroesophageal reflux: a critical review and framework for further investigation. *Curr Gastroenterol Rep* 9: 219-24, 2007.
37. **St-Hilaire M, Nsegbe E, Gagnon-Gervais K, Samson N, Moreau-Bussière F, Fortier PH, Praud JP.** Laryngeal chemoreflexes induced by acid, water, and saline in nonsedated newborn lambs. *J Appl Physiol* 98: 2197-203, 2005.
38. **St-Hilaire M, Samson N, Nsegbe E, Duvareille C, Moreau-Bussière F, Micheau P, Lebon J, Praud JP.** Postnatal maturation of laryngeal chemoreflexes in the preterm lamb. *J Appl Physiol* 102: 1429-38, 2007.
39. **Thach BT.** Some aspects of clinical relevance in the maturation of respiratory control in infants. *J Appl Physiol* 104: 1828-34, 2008.
40. **Theobald K, Botwinski C, Albanna S, McWilliam P.** Apnea of prematurity: diagnosis, implications for care, and pharmacologic management. *Neonatal Netw* 19: 17-24, 2000.
41. **Wang W, Tovar JA, Eizaquirre I, Aldazabal P.** Continuous positive airway pressure and gastroesophageal reflux: an experimental study. *J Pediatr Surg* 29: 730-3, 1994.
42. **Zhao J, Gonzalez F, Mu D.** Apnea of prematurity: from cause to treatment. *Eur J Pediatr* 170: 1097-105, 2011.

## DISCUSSION

Cette étude effectuée chez l'agneau prématuré dans le but d'évaluer les effets de la caféine et de la pression positive continue nasale sur les événements cardiorespiratoires induits par les CRL dans des conditions expérimentales standardisées, a révélé une diminution des apnées, des bradycardies et des désaturations sous PPCN par rapport à la situation contrôle. Au contraire, la réponse à la caféine est très variable d'un agneau à l'autre, avec globalement une absence d'effet.

### **Modèle d'agneau prématuré**

Des nouveau-nés prématurés de quelques espèces animales, incluant les porcelets (Sutherland et al., 2012), les singes (Rasch et al., 2010) et même les souris (Besnard et al., 2011), ont été utilisés dans de rares expérimentations. C'est en fait l'agneau prématuré qui a été le plus utilisé sur le plan cardiorespiratoire, généralement à la naissance pour des études aiguës de quelques heures (Polglase et al., 2009; De Matteo et al., 2008; Pillow et al., 2004; Pillow et al., 2007; Tarczy-Hornoch et al., 1998; Reyburn et al., 2008). Ces études ont surtout permis une avancée dans la compréhension des détresses respiratoires aiguës chez le prématuré humain.

Notre laboratoire a utilisé le modèle d'agneau prématuré depuis de nombreuses années dans plusieurs études sur le contrôle respiratoire, la dynamique laryngée et les apnées du prématuré à court et à long terme sur une période allant de quelques jours (Renolleau et al., 1999; Reix et al., 2003; St-Hilaire et al., 2007; Patural et al., 2010) à quelques semaines (Arsenault et al., 2003).

Nos premiers modèles (Renolleau et al., 1999; Arsenault et al., 2003) naissaient à un AG de 132 j après administration intramusculaire (IM) de 0,5 mg/kg de

bétaméthasone et injection par voie intra veineuse (IV) lente de 400 µg de thyrotropin-releasing-hormone (TRH) à 48, 36, 24 et 12h avant l'induction de l'accouchement, de façon à accélérer la maturation du surfactant pulmonaire et éviter une maladie des membranes hyalines sévère à la naissance.

Douze heures avant l'accouchement, un gel de prostaglandine (PGE2) était placé sur le col utérin par voie vaginale pour accélérer la dilatation cervicale, et les agneaux naissaient par voie basse sans assistance, sauf en cas de complications. Après la naissance, l'agneau était immédiatement intubé avec administration de surfactant intratrachéal, puis extubé. Il était ensuite asséché avec des serviettes réchauffées, pesé et directement mis dans un incubateur où un examen clinique initial était pratiqué et un monitoring continu des signes vitaux était débuté. L'agneau était ensuite retourné à la brebis si tous ses signes vitaux étaient bons. Dans le cas d'hypothermie et/ou d'hypoglycémie, il était gardé dans un incubateur avec une alimentation par gavage gastrique. Dans le cas de détresse respiratoire, une intubation endotrachéale était pratiquée pour ventilation mécanique sous sédation de l'agneau et une voie veineuse était mise en place pour l'administration de solutés d'hydratation et de dextrose à 10%. Avec ce modèle, 28 accouchements ont été effectués, 46 agneaux sont nés, mais seulement 17 agneaux ont survécu suffisamment longtemps pour participer à des études (Renolleau et al. , 1999; Reix et al. , 2003; Arsenault et al., 2003).

Le dernier modèle d'agneau prématuré adopté par notre laboratoire (St-Hilaire et al., 2007), naissait à 132 j d'AG par césarienne sous péridurale après injection IM de bétaméthasone. La prise en charge intensive (intubation endotrachéale immédiate pour administration de surfactant et utilisation de PPCN systématique pour quelques heures, mise en incubateur pour maintien de la température et surveillance, gavage gastrique) n'a pas permis d'avoir un taux de survie supérieur à 50% sur la totalité des naissances.

Dans notre modèle actuel, notre prise en charge se voulait la plus proche possible des conditions physiologiques avec un agnelage prématuré à 133 j de gestation, soit 14 j avant le terme normal de naissance qui est de 147 j chez la brebis, et une prise en charge à la naissance la moins agressive possible.

Nous avons établi un protocole qui consistait à déclencher la brebis à 131 j d'âge gestationnel en lui administrant par voie IM de la bétaméthasone, un corticoïde stimulant la maturation pulmonaire de l'agneau, et de la mifépristone, un anti progestatif 24h plus tard pour induire le travail. Tous nos agneaux sont nés à 133 j d'âge gestationnel.

Après la naissance l'agneau a été laissé dans l'enclos avec la brebis, placé sous une lampe chauffante et ses signes vitaux à savoir la température, la fréquence cardiaque, la fréquence respiratoire et la saturation d'oxygène, ont été recueillis toutes les heures les 6 premières heures de vie, puis toutes les 3 heures. Un apprentissage a été fait durant les 48 premières heures de la tétée jusqu'à l'autonomie complète. Une vérification de la glycémie était faite une à 2 fois par jour en fonction de l'état clinique de l'agneau (agneau amorphe avec hypotonie, hypothermie, altération de l'état de conscience), et si nécessaire une supplémentation par biberon en colostrum de brebis ou colostrum artificiel reconstitué était donné. Un gavage gastrique était prévu au besoin si le réflexe de succion n'était pas efficace; la totalité de nos agneaux était autonome passé ce délai. À noter que cette prise en charge nécessitait d'être présent constamment durant 48h pour surveiller que la brebis s'occupait correctement de son agneau, c'est-à-dire qu'elle ne le stimulait pas de façon trop agressive pour qu'il se lève. Nous avons eu dans le passé quelques cas d'agneaux prématurés morts, écrasés par leur mère dans les 2 premiers jours de vie, par excès de stimulation.

Cette prise en charge peu interventionniste adoptée antérieurement dans quelques rares études sur le modèle agneau prématuré a prouvé son efficacité

(Rurak et al., 2008; Walker et al., 1991; De Matteo et al., 2009) et nous a permis d'obtenir un taux de survie > 90% avec un total de 12 agneaux pour 7 accouchements programmés.

Ce modèle très original, et maintenant bien au point, va permettre à notre laboratoire d'effectuer plus régulièrement des études sur le contrôle respiratoire néonatal dans les années à venir.

### **Chémoréflexes laryngés**

Les CRL constituent un mécanisme majeur dans la protection des VAI (Thach, 2008).

Dans notre étude, quelle que soit la solution utilisée pour induire les CRL (lait ou HCl) les manifestations observées étaient surtout cardiorespiratoires (apnées, bradycardies et désaturations) ce qui rejoint les données déjà décrites précédemment dans notre laboratoire par Marie St-Hilaire et coll chez les agneaux prématurés. Les événements sévères ont été observés uniquement avec l'HCl et leur gravité est liée à l'immaturité du système nerveux central occasionnant une exagération de la réponse inhibitrice des CRL (St-Hilaire et al., 2007; Praud, 2010).

Les déglutitions, la toux et l'éveil sont des mécanismes de protection visant à la fois à prévenir l'aspiration trachéale et à favoriser l'expulsion du liquide en dehors du larynx au cours des CRL. Aucun effet de la PPCN, de la caféine et/ou PPCN/caféine n'a été observé sur ces variables par rapport à la situation contrôle. Par ailleurs, l'augmentation de la pression artérielle, mécanisme de protection essentiel dans la redistribution du sang au niveau des organes nobles (Marchal et al., 1982) a été diminuée de façon très significative sous PPCN par rapport à la situation contrôle, quelle que soit la solution injectée, sans que cela



pose apparemment problème aux agneaux. En fait, étant donné que l'inhibition cardiorespiratoire est moins marquée, il n'est pas étonnant que la réaction sympathique secondaire responsable de l'augmentation de la pression artérielle systémique soit aussi moins importante.

### **Effet de la caféine**

Du fait de son efficacité et de sa sécurité (Ducrocq et al., 2006; Mueni et al., 2009; Aranda et al., 2010; Schmidt et al., 2006), la caféine est un médicament utilisé comme traitement de première intention dans les apnées idiopathiques sévères du prématuré.

### **Mécanisme d'action**

C'est un médicament qui appartient à la classe des méthylxanthines et qui agit comme stimulant du système nerveux central. À forte concentration, la caféine agit en inhibant les phosphodiesterases et en augmentant l'AMPc; à faible dose, elle agit comme antagoniste des récepteurs à l'adénosine présents dans le cerveau et le système cardiorespiratoire.

L'effet stimulant de la caféine est attribué d'une part au blocage des récepteurs  $A_{2A}$  qui stimulent les neurones GABAergiques et d'autre part au blocage des récepteurs  $A_1$ . Une forte affinité à ces récepteurs  $A_1$  inhibe l'adényl cyclase, alors qu'une faible affinité des récepteurs  $A_2$  stimule l'activité de cette enzyme (Aranda et al., 2010).

La stimulation des centres cardiorespiratoires bulbaires a comme conséquence une augmentation de la ventilation minute et de la sensibilité au  $CO_2$  avec une diminution de la dépression respiratoire hypoxique et de la respiration périodique (Martin et al., 2005; Abu-Shaweesh et al., 2008).

## **Posologie et pharmacodynamique**

Elle est administrée sous forme de citrate de caféine par voie IV ou per os avec une dose de charge de 20 mg/kg et une dose d'entretien de 5 mg/kg/j (Schmidt et al., 2006; Aranda et al., 2010). Elle a une faible dégradation hépatique (déficit du système enzymatique cytochrome P450) liée à l'immaturité du foie néonatal et un index thérapeutique large ( $\frac{1}{2}$  vie plasmatique de 100h).

## **Propriétés**

La caféine agit en améliorant la fonction des muscles ventilatoires facilitant l'extubation lors du sevrage de la ventilation mécanique endotrachéale (Kassim et al., 2009) et diminuant ainsi les séquelles de la dysplasie bronchopulmonaire.

## **Complications et effets indésirables**

Des craintes sur les effets de la caféine ont fait l'objet de nombreuses études avec une mise en évidence d'une perte pondérale transitoire à court terme (Schmidt et al., 2006) et d'une altération du contrôle respiratoire à long terme avec une augmentation de la ventilation minute au repos et un raccourcissement du temps de sommeil chez des rats adultes ayant reçu de la caféine en période néonatale (Montandon et al., 2009).

L'essai randomisé de Schmidt réalisé sur une population de 2006 prématurés humains dont le poids de naissance était compris entre 500 et 1250 g a révélé qu'à l'âge de 18 - 21 mois le taux de survie et les séquelles neurologiques étaient moindres dans le groupe traité par la caféine comparé au groupe placebo (Schmidt, 2007). L'évaluation 5 ans plus tard du développement psychomoteurs chez ces mêmes prématurés (Schmidt et al., 2012) n'a pas montré de différence significative du taux de décès et des troubles cognitifs entre les deux groupes.

## **Efficacité de la caféine dans les apnées du prématuré**

L'utilisation de la caféine dans le traitement des apnées du prématuré n'est pas toujours suffisante (Bhatt-Mehta et al., 2003) et l'association d'un support ventilatoire notamment la PPCN est souvent nécessaire (Davis et al., 2010 ; Zhao et al., 2011). Dans certains cas (Dibiasi, 2009) l'intubation endotrachéale pour ventilation mécanique devient l'option de dernier recours.

Le rôle bénéfique de la caféine dans l'atténuation des événements cardiorespiratoires liés aux CRL a été évoqué chez 3 agneaux ayant reçu de la caféine pour des apnées liées à des malaises graves dans une étude antérieure non contrôlée du laboratoire (St-Hilaire et al., 2007). Par ailleurs, une seule autre étude, à notre connaissance, a testé l'effet d'une autre xanthine, l'aminophylline, sur les événements cardiorespiratoires induits par des CRL. Dans cette étude, l'introduction de lait de vache dans la région du larynx chez quatre porcelets a provoqué des apnées, des bradycardies et une hypertension qui ont cessé après l'administration d'aminophylline (50 mg IV). Cependant, lorsque l'expérience a été répétée un peu plus tard, alors que les effets de l'aminophylline étaient encore présents, seule une réponse transitoire était observée. De plus, le remplacement du lait par l'eau a engendré des apnées plus longues et il a fallu un supplément de 50 mg IV d'aminophylline pour restaurer l'activité respiratoire (Lee et al., 1977). À noter que le plan de ces 2 études suggérant un effet des xanthines sur les événements cardiorespiratoires des CRL n'était pas destiné au départ à tester cet effet, et que les résultats en question ont été obtenus par une analyse effectuée à posteriori.

Dans nos conditions expérimentales, la caféine n'a globalement pas eu d'effet sur les événements cardiorespiratoires, quelle que soit la solution ou la variable étudiée. Ces résultats appellent les commentaires suivants :

- 1- Notre étude des CRL a été réalisée précocement après l'injection de la caféine, soit entre 1h et 4h après; cependant, ceci ne semble pas poser

de problème, puisque l'effet de la caféine est rapide avec une dose thérapeutique atteinte en 30 minutes (Aranda et al., 1979).

- 2- L'effet de la caféine sur les apnées chez les agneaux était variable d'un agneau à l'autre avec une réduction du nombre et de la durée des apnées chez certains mais une absence d'effets chez d'autres. Cette variabilité individuelle de l'effet de la caféine sur les apnées du prématuré est aussi observée chez le prématuré humain (Paul et al., 2009; Henderson-Smart et al., 2010; Erenberg et al., 2000). De plus, il a été rapporté que la caféine n'avait pas d'effet sur les bradycardies et l'hypoxémie, sans préciser cependant si ces événements étaient associés ou non aux apnées (Bucher et al., 1988). Les limitations de l'efficacité de l'action de la caféine (Poets, 2010) nécessiteraient pour être mieux comprises des études ultérieures, d'autant plus qu'il n'existe pas actuellement, selon nos connaissances, des données directes d'essais randomisés sur l'effet des méthylxanthines sur la sévérité des apnées et son association avec les bradycardies et désaturations (Henderson-Smart et al., 2010).

Nous n'avons pas noté de différence évidente entre les agneaux qui ont répondu favorablement à la caféine (3 agneaux) et ceux qui ne l'avaient pas (4 agneaux) sur les diverses variables étudiées. La comparaison non statistique (du fait du nombre réduit des deux groupes) portant sur les déglutitions, la toux, la présence ou pas d'éveil et de réaction d'éveil chez les agneaux qui ont amélioré leurs événements cardiorespiratoires sous caféine n'a pas montré de différence évidente, surtout en ce qui concerne la présence de l'éveil et de la réaction d'éveil, qui aurait pu expliquer l'amélioration des événements cardio-respiratoires par stimulation du système sympathique.

## **Effet de la pression positive continue nasale**

La PPCN est une assistance respiratoire non invasive qui permet une respiration spontanée des nourrissons souffrant de maladies respiratoires depuis plus de 40 ans.

### **Effets physiologiques**

Les conséquences de l'application d'une PPCN sont :

- une distension des voies aériennes supérieures avec une diminution de la résistance à leur niveau (Dibiasi, 2009);
- le maintien de l'expansion pulmonaire et une amélioration de la compliance (De Winter et al., 2010);
- une diminution du travail respiratoire et de la  $\text{PaCO}_2$  (Bancalari et al., 2008);
- une stabilisation de la fréquence respiratoire (Mathew et al., 1984);
- une amélioration du recrutement alvéolaire (Courtney et al., 2001);
- Une augmentation de la CRF et de la  $\text{PaO}_2$ .

### **Indications**

Les principales utilisations de la PPCN en période néonatale sont :

- les détresses respiratoires aiguës du nouveau-né;
- les suites chirurgicales des cardiopathies congénitales;
- la dysplasie bronchopulmonaire et le sevrage de la ventilation endotrachéale;
- les apnées obstructives, mixtes et centrales du nouveau-né, incluant les apnées du prématuré.

### **Avantages**

Parmi les nombreux bénéfices de la PPCN (De Paoli, 2003; Dibiasi, 2009) on note la préservation de la respiration spontanée, la diminution des lésions

pulmonaires et la facilité du sevrage de la ventilation endotrachéale et l'extubation.

### **Complications**

On note des traumatismes qui sont variables selon l'interface utilisée allant de l'irritation de la muqueuse nasale à la lésion de la cloison nasale en cas d'utilisation de lunettes nasales et de l'aile du nez lorsqu'il s'agit de canule nasale unilatérale (Dibiasi, 2009).

Avec des PPCN à des hauts niveaux de pression, des complications comme le pneumothorax, l'emphysème, le pneumo médiastin, la pneumatocèle et l'embolie vasculaire peuvent survenir, ainsi qu'une distension digestive gastrique et intestinale.

### **Efficacité de la PPCN**

Dans notre étude l'utilisation de la PPCN seule a réduit le nombre d'apnées, de bradycardies et de désaturations contrairement à la caféine seule où à la caféine combinée à la PPCN.

L'amélioration des réserves pulmonaire en oxygène fournie par la PPCN a probablement permis de prévenir les désaturations et les bradycardies (Dibiasi, 2009; Mathew, 2011). Cependant à l'heure actuelle aucun mécanisme ne peut expliquer la diminution du nombre des apnées sous PPCN.

### **Limitation de l'étude**

La complexité de nos conditions d'enregistrement a constitué une limitation à notre étude avec une évaluation des événements cardiorespiratoires limitée à 4

heures alors qu'en clinique, l'efficacité du traitement est évaluée sur une durée plus longue, particulièrement pour la caféine entre 2 à 7 jours (Zhao, 2011).

Nos résultats restent néanmoins pertinents puisqu'ils ont montré l'efficacité de la PPCN par rapport à la caféine sur les apnées –bradycardies secondaires aux CRL.

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Notre étude nous a permis de tester l'effet de deux thérapeutiques qui ont prouvé leur efficacité dans la prise en charge des apnées du prématuré.

Nos résultats ont conclu à l'absence d'effet global de la caféine sur les apnées induites par les CRL, avec une réponse variable d'un agneau à un autre, alors que l'effet bénéfique de la PPCN sur les variables cardiorespiratoires était plus constant.

L'ajout de la PPCN est déjà pratiqué de routine en clinique après quelques heures d'observation de l'inefficacité du traitement par la caféine. Mais nos résultats suggèrent que la PPCN pourrait être une alternative à considérer d'emblée si le tableau clinique suggère la responsabilité des CRL dans les apnées chez un prématuré, en particulier lorsqu'un reflux laryngo-pharyngé semble présent simultanément aux événements cardiorespiratoires.

Cependant, comme il n'existe actuellement aucune étude systématique sur l'effet de la PPCN sur les reflux gastriques chez les nouveau-nés, et que l'utilisation de la PPCN peut faire craindre une augmentation des reflux laryngopharyngés, cette perspective ne peut rester qu'une suggestion. Il est à noter toutefois que l'utilisation de la PPCN chez les adultes a montré qu'une PPCN à 5 cmH<sub>2</sub>O n'augmentait pas les reflux gastriques, et même les diminuait en cas de syndrome d'apnées obstructives (Kerr, 1992). Il est donc impératif d'étudier les effets de la PPCN sur les reflux gastroœsophagiens et pharyngolaryngés, ainsi que sur la motilité œsophagienne en période néonatale. Cette étude est prévue dans notre laboratoire chez l'agneau. Si l'innocuité de la PPCN est prouvée, ce traitement permettra de mieux standardiser la prise en charge des apnées du prématuré.



## REMERCIEMENTS

**Au Dr. Jean-Paul Praud,**

Merci de m'avoir initié à la recherche, de votre aide et de votre soutien durant mon passage au niveau de votre laboratoire.

**Au Professeur Chraïbi et au Professeur Cantin** d'avoir accepté de juger mon travail malgré vos emplois du temps chargés.

**À Nathalie Samson, Marie St-Hilaire, Jean-Philippe Gagné, Anne Bernier, Mohamed Amine Hadj-Ahmed, Marie-Laure Specq, Vincent Carrière, Djamal –Dine Djeddi, Charlène Nadeau,**

Votre aide et votre amitié m'ont permis de m'intégrer dans le laboratoire et d'avancer dans mon projet de recherche.

**À mon époux Atmane,**

Malgré les difficultés de la séparation et de l'éloignement, ton soutien infailible m'a donné le courage de continuer.

**À mes parents, mes frères, mes sœurs, mes neveux et nièces** Votre affection et vos encouragements m'ont toujours permis d'avancer dans mes projets aussi bien professionnels que personnels.

## RÉFÉRENCES

1. **Abu-Shaweesh JM, Martin RJ.** (2008) Neonatal apnea: what's new? *Pediatr Pulmonol* 43:937-44.
2. **Aranda JV, Cook CE, Gorman W, Collinge JM, Loughnan PM, Outerbridge EW, Aldridge A, Neims AH.** (1979) Pharmacokinetic profile of caffeine in the premature newborn infant with apnea. *J Pediatr* 94:663-8.
3. **Aranda JV, Beharry K, Valencia GB, Natarajan G, Davis J.** (2010) Caffeine impact on neonatal morbidities. *Matern Fetal Neonatal Med* 23(S3):20–23.
4. **Arsenault J, Moreau-Bussiere F, Reix P, Niyonsenga T, Praud JP.**(2003) Postnatal maturation of vagal respiratory reflexes in preterm and full-term lambs.(2003). *J Appl Physiol* 94(5):1978-86
5. **Bancalari E, Claure N.** (2008) Non-invasive ventilation of the preterm infant. *Early Hum Dev* 84(12):815-9.
6. **Besnard V, Wert SE, Ikegami M, Xu Y, Heffner C, Murray SA, Donahue LR, Whitsett JA.** (2011) Maternal synchronization of gestational length and lung maturation. *PLoS One* 6(11):e26682.
7. **Bhatt-Mehta V, Schumacher RE.** (2003) Treatment of apnea of prematurity. *Paediatr Drugs* 5(3):195-210.
8. **Bucher HU, Duc G.** (1988) Does caffeine prevent hypoxaemic episodes in premature infants? A randomized controlled trial. *Eur J Pediatr* 147(3):288-91.
9. **Carreau AM, Patural H, Samson N, Doueik AA, Hamon J, Fortier PH, Praud JP.** (2011) Effects of simulated reflux laryngitis on laryngeal chemoreflexes in newborn lambs. *J Appl Physiol*.111(2):400-6.
10. **Corvaglia L, Zama D, Spizzichino M, Aceti A, Mariani E, Capretti MG, Galletti S, Faldella G.** (2011) The frequency of apneas in very preterm infants is increased after non-acid gastro-esophageal reflux. *Neurogastroenterol Motil* 23(4):303-7.
11. **Courtney SE, Pyon KH, Saslow JG, Arnold GK, Pandit PB, Habib RH.** (2001) Lung recruitment and breathing pattern during variable versus continuous flow nasal continuous positive airway pressure in premature infants: an evaluation of three devices. *Pediatrics* 107 (2):304-8.
12. **David W.Carley, Miodrag Radulovacki.** (2003) Sleep-Related Breathing Disorders Experimental Models and Therapeutic Potential 171:234-5.
13. **Davis PG, Schmidt B, Roberts RS, Doyle LW, Asztalos E, Haslam R, Sinha S, Tin W; Caffeine for Apnea of Prematurity Trial Group.** (2010) Caffeine for Apnea of Prematurity trial: benefits may vary in subgroups. *J Pediatr* 156 (3):382-7.
14. **De Matteo R, Snibson K, Thompson B, Koumoundouros E, Harding R.** (2009) Lung function in developing lambs: is it affected by preterm birth? *J Appl Physiol* 107(4):1083-8.

15. **De Paoli AG, Morley C, Davis PG.** (2003) Nasal CPAP for neonates: what do we know in 2003? *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 88 (3):F168-72.
16. **De Winter JP, de Vries MA, Zimmermann LJ.** (2010) Clinical practice: non-invasive respiratory support in newborns. *Eur J Pediatr* 169 (7):777-82.
17. **Dibiasi RM.** (2009) Nasal continuous positive airway pressure (CPAP) for the respiratory care of the newborn infant. *Respir Care* 54(9):1209-35.
18. **Ducrocq S, Biran-Mucignat V, Lebas F, Baudon JJ, Gold F.** (2006) Caffeine citrate utilization for treatment of apnea in French neonatal units. *Arch Pediatr* 13 (10):1305-8.
19. **Erenberg A, Leff RD, Haack DG, Mosdell KW, Hicks GM, Wynne BA.** (2000) Caffeine citrate for the treatment of apnea of prematurity: a double-blind, placebo-controlled study. *Pharmacotherapy* 20(6):644-52.
20. **Henderson-Smart DJ, De Paoli AG.** (2010) Methylxanthine treatment for apnoea in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* (12):CD000140.
21. **Kerr P, Shoenut JP, Millar T, Buckle P, Kryger MH.** (1992) Nasal CPAP reduces gastroesophageal reflux in obstructive sleep apnea syndrome. *Chest* 101(6):1539-44.
22. **Lee JC, Stoll BJ, Downing SE.** (1977) Properties of the laryngeal chemoreflex in neonatal piglets. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 233:R30–R36.
23. **Leiter JC, Böhm I.** (2007) Mechanisms of pathogenesis in the Sudden Infant Death Syndrome. *Respir Physiol Neurobiol* 159:127-38.
24. **Mathew OP, Sant'Ambrogio G, Fisher JT, Sant'Ambrogio FB.** (1984) Laryngeal pressure receptors. *Respir Physiol* 57(1):113-22.
25. **Mathew OP.** (2011) Apnea of prematurity: pathogenesis and management strategies. *J Perinatol* (5):302-10.
26. **Marchal F, Corke BC, Sundell H.** (1982) Reflex apnea from laryngeal chemo-stimulation in the sleeping premature newborn lamb. *Pediatr Res* 16 (8):621-7.
27. **Martin RJ, Abu-Shaweesh JM.** (2005) Control of breathing and neonatal apnea. *Biol Neonate* 87(4):288-95.
28. **Montandon G, Horner RL, Kinkead R, Bairam A.** (2009) Caffeine in the neonatal period induces long-lasting changes in sleep and breathing in adult rats. *J Physiol* 587(Pt 22):5493-507.
29. **Moriette G, Lescure S, El Ayoubi M, Lopez E.** (2010) Apnea of prematurity: what's new? *Arch Pediatr* 17 (2):186-90.
30. **Mueni E, Opiyo N, English M.** (2009) Caffeine for the management of apnea in preterm infants. *Int Health* 1(2):190-195.
31. **Nunez J, Cristofalo E, McGinley B, Katz R, Glen DR, Gauda E.** (2011) Temporal association of polysomnographic cardiorespiratory events with GER detected by MII-pH probe in the premature infant at term. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 52 (5):523-3.
32. **Paul K, Melichar J, Miletín J, Dittrichová J.** (2009) Differential diagnosis of apneas in preterm infants. *Eur J Pediatr* 168(2):195-201.

33. **Patural H, St-Hilaire M, Pichot V, Beuchée A, Samson N, Duvareille C, Praud JP.** (2010) Postnatal autonomic activity in the preterm lamb. *Res Vet Sci*.89(2):242-9.
34. **Pillow JJ, Hillman N, Moss TJ, Polglase G, Bold G, Beaumont C, Ikegami M, Jobe AH.** (2007) Bubble continuous positive airway pressure enhances lung volume and gas exchange in preterm lambs. *Am J Respir Crit Care Med* 176 (1):63-9.
35. **Pillow JJ, Jobe AH, Collins RA, Hantos Z, Ikegami M, Moss TJ, Newnham JP, Willet KE, Sly PD.** (2004) Variability in preterm lamb lung mechanics after intra-amniotic endotoxin is associated with changes in surfactant pool size and morphometry. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287 (5):L992-8.
36. **Poets CF.** (2010) Apnea of prematurity: What can observational studies tell us about pathophysiology? *Sleep Med* 11(7):701-7.
37. **Poets CF.** (2010) Interventions for apnoea of prematurity: a personal view. *Acta Paediatr* 99(2):172-7.
38. **Poets CF, Brockmann PE.** (2011) Myth: gastroesophageal reflux is a pathological entity in the preterm infant. *Semin Fetal Neonatal Med* 16 (5):259-63.
39. **Polglase GR, Hooper SB, Gill AW, Allison BJ, McLean CJ, Nitsos I, Pillow JJ, Kluckow M.** (2009) Cardiovascular and pulmonary consequences of airway recruitment in preterm lambs. *J Appl Physiol* 106(4):1347-55.
40. **Pickens DL, Schefft GL, Storch GA, Thach BT.** (1989) Characterization of prolonged apneic episodes associated with respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Pulmonol* 6(3):195-201.
41. **Praud J-P.** (2010) Upper airway reflexes in response to gastric reflux. *Paediatr Respir Rev* 11:208-12.
42. **Rasch S, Sangild PT, Gregersen H, Schmidt M, Omari T, Lau C.** (2010) The preterm piglet a model in the study of oesophageal development in preterm neonates. *Acta Paediatr* 99 (2):201-8.
43. **Reix P, St-Hilaire M, Praud JP.** (2007) Laryngeal sensitivity in the neonatal period: from bench to bedside. *Pediatr Pulmonol* 42(8):674-82.
44. **Reyburn B, Li M, Metcalfe DB, Kroll NJ, Alvord J, Wint A, Dahl MJ, Sun J, Dong L, Wang ZM, Callaway C, McKnight RA, Moyer-Mileur L, Yoder BA, Null DM, Lane RH, Albertine KH.** (2008) Nasal ventilation alters mesenchymal cell turnover and improves alveolarization in preterm lambs. *Am J Respir Crit Care Med* 178 (4):407-18.
45. **Renolleau S, Letourneau P, Niyonsenga T, Praud JP, Gagné B.** (1999) Thyroarytenoid muscle electrical activity during spontaneous apneas in preterm lambs. *Am J Respir Crit Care Med*.159(5 Pt 1):1396-404.
46. **Rurak DW, Fay S, Gruber NC.** (2008) Measurement of rest and activity in newborn lambs using actigraphy: studies in term and preterm lambs. *Reprod Fertil Dev* 20(3):418-30.

47. **Schmidt B, Roberts RS, Davis P, Doyle LW, Barrington KJ, Ohlsson A, Solimano A, Tin W.** (2006) Caffeine for Apnea of Prematurity Trial Group. *N Engl J Med* 354(20):2112-2.
48. **Schmidt B, Roberts RS, Davis P, Doyle LW, Barrington KJ, Ohlsson A, Solimano A, Tin W; Caffeine for Apnea of Prematurity Trial Group.** (2007) Long-term effects of caffeine therapy for apnea of prematurity. *N Engl J Med* 357(19):1893-902.
49. **Schmidt B, Anderson PJ, Doyle LW, Dewey D, Grunau RE, Asztalos EV, Davis PG, Tin W, Moddemann D, Solimano A, Ohlsson A, Barrington KJ, Roberts RS. Caffeine for Apnea of Prematurity (CAP) Trial Investigators.** (2012) Survival without disability to age 5 years after neonatal caffeine therapy for apnea of prematurity. *JAMA* 307(3):275-82.
50. **Sladek M, Grogard JB, Parker RA, Sundell HW.** (1993) Prolonged hypoxemia enhances and acute hypoxemia attenuates laryngeal reflex apnea in young lambs. *Pediatr Res* 34(6):813-20.
51. **Slocum C, Hibbs AM, Martin RJ, Orenstein SR.** (2007) Infant apnea and gastroesophageal reflux: a critical review and framework for further investigation. *Curr Gastroenterol Rep* 9 (3):219-24.
52. **Sutherland MR, Yoder BA, McCurnin D, Seidner S, Gubhaju L, Clyman RI, Black MJ.** (2012) Effects of ibuprofen treatment on the developing preterm baboon kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* Feb 22. [Epub ahead of print]
53. **St-Hilaire M, Samson N, Nsegbe E, Duvareille C, Moreau-Bussière F, Micheau P, Lebon J, Praud JP.** (2007) Postnatal maturation of laryngeal chemoreflexes in the preterm lamb. *J Appl Physiol* 102(4):1429-38.
54. **St-Hilaire M, Duvareille C, Avoine O, Carreau AM, Samson N, Micheau P, Doueik A, Praud JP.** (2010) Effects of postnatal smoke exposure on laryngeal chemoreflexes in newborn lambs. *J Appl Physiol* 109(6):1820-6.
55. **Tarczy-Hornoch P, Hildebrandt J, Standaert TA, Jackson JC.** (1998) Surfactant replacement increases compliance in premature lamb lungs during partial liquid ventilation in situ. *J Appl Physiol* 84(4):1316-22.
56. **Thach BT.** (2008) Some aspects of clinical relevance in the maturation of respiratory control in infants. *J Appl Physiol* 104:1828-34.
57. **Thach BT.** (2001) Maturation and transformation of reflexes that protect the laryngeal airway from liquid aspiration from fetal to adult life. *Am J Med* 111 (8A):69S-77S.
58. **Walker AM, de Preu ND.** (1991) Preterm birth in lambs: sleep patterns and cardio-respiratory changes. *J Dev Physiol* 16(3):139-45.
59. **Xia L, Damon T, Leiter JC, Bartlett D Jr.** (2008) Elevated body temperature exaggerates laryngeal chemoreflex apnea in decerebrate piglets. *Adv Exp Med Biol* 605:249-54.
60. **Zhao J, Gonzalez F, Mu D.** (2011) Apnea of prematurity: from cause to treatment. *Eur J Pediatr* 170(9):1097-105.